

CECÍLIA ALICE MATTIELLO

**AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO INDUSTRIAL, ATRIBUTOS
MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DE QUEIJO
COLONIAL PRODUZIDO A PARTIR DE LEITE COM DOIS
DIFERENTES NÍVEIS DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

Coorientadora: Prof. Dra. Sheila Mello da Silveira

**LAGES – SC
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela autora, com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Mattiello, Cecília Alice

Avaliação do rendimento industrial, atributos
microbiológicos e físico-químicos de queijo colonial
produzido a partir de leite com dois diferentes
níveis de células somáticas / Cecília Alice
Mattiello. Lages - 2016.

106 p.

Orientador: Andre Thaler Neto

Co-orientadora: Sheila Mello Da Silveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Células somáticas. 2. Qualidade do leite.
3. Queijo colonial. 4. Rendimento industrial. I.
Thaler Neto, Andre. II. Da Silveira, Sheila Mello.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV.
Título.

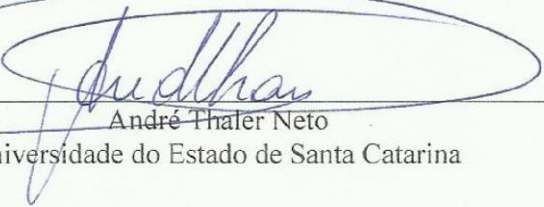
CECÍLIA ALICE MATTIELLO

**AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO INDUSTRIAL, ATRIBUTOS
MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DE QUEIJO
COLONIAL PRODUZIDO A PARTIR DE LEITE COM DOIS
DIFERENTES NÍVEIS DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

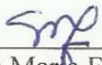
Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração: Produção Animal.

Banca Examinadora:


Orientador: _____


André Thaler Neto
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____


Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____


Diógenes Dezen
Instituto Federal Catarinense

Lages, 04/03/2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suas muitas bênçãos.

Aos meus pais, Márcia e Osmar, exemplos de vida que sempre me dedicaram muito amor e carinho, e por serem apoio em todas as horas difíceis e o impulso para superar obstáculos.

Às minhas irmãs, Celita e Sabrina, que completam nossa família perfeitamente e que exercem os papéis de irmãs com louvor.

Ao João Gabriel, pelos praticamente 9 anos de amizade, companheirismo e amor, nas melhores e piores horas. Pela compreensão e paciência e pelos sonhos que já realizamos e ainda vamos realizar juntos.

Ao professor Thaler, exemplo a ser seguido, profissional e pessoal. Dedicção ímpar para com os seus e possuidor do maior coração do mundo. Muito obrigada por ter me recebido, pelo apoio, por me reerguer e pelas oportunidades proporcionadas.

À professora Sheila, que passou de co-orientadora à amiga, muito obrigada pela oportunidade, pela orientação, pelo laboratório, pela força, pela psicologia e pela amizade.

À professora Lídia, pelos muitas vezes em que me recebeu em sua sala, me aconselhou e disse: Vai dar tudo certo!

À Aline, um presente bem vindo que chegou no dia da seleção para o mestrado e que vai durar para sempre.

Aos amigos Michele e Leonardo e Cláudia e Leonardo, que por muitas vezes foram mais que amigos, foram família.

À todas as minhas queridas estagiárias (e amigas) do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – IFC/Concórdia: Marina, Janaína, Larissa, Vanessa, Karine, Sáskia, Letícia, Lígia, Milena e em especial Mariane. A esta, minha prima, que por uma feliz coincidência acabamos por trabalharmos juntas e que me acolheu (e aguentou) carinhosamente durante esse período em Concórdia.

Ao Fiscal Federal Flávio, que por muitas vezes foi decisivo e nos proporcionou a oportunidade de realizarmos esse projeto dentro de uma indústria.

Aos funcionários e colaboradores do Laticínio, que tomaram para si o projeto e fizeram todo o possível para que este se realizasse.

Ao Anildo, pelas análises realizadas na EMBRAPA – Suínos e Aves.

Aos professores e colaboradores do Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia pelo apoio.

Aos amigos e colegas, que de um jeito ou de outro contribuíram: Ângela, Ana Paula, Nadine, Dileta (estatisticamente significativa) e os demais colegas do grupo de Bovinocultura de Leite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

A todos esses, meu muito obrigada!

“On ne reçoit pas la sagesse, il faut la découvrir soi-même après un trajet que personne ne peut faire pour nous, ne peut nous épargner.”

“A sabedoria não nos é dada,. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

RESUMO

O queijo colonial é um queijo produzido há décadas no sul do Brasil. Historicamente era produzido de forma artesanal à base de leite cru, sendo atualmente produzido em escala industrial, a partir de leite pasteurizado. Contudo, apesar da grande apreciação e consumo deste queijo, ele ainda não possui um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que estabeleça normas e padrões para a sua produção. As células somáticas estão presentes naturalmente no leite, mas quando em mastite a sua contagem aumenta. Em consequência à mastite, ocorrem alterações na composição do leite como diminuição da síntese de componentes do leite pela glândula mamária, diminuição do volume de leite produzido e passagem de componentes do sangue para o leite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da contagem de células somáticas (CCS) sobre o rendimento industrial do queijo colonial e a conformidade microbiológica e físico-química dos queijos produzidos. O estudo foi desenvolvido em um laticínio sob inspeção federal, em delineamento inteiramente casualizado, sendo produzidos 14 lotes de queijo colonial, com sete repetições para cada um de dois níveis de células somáticas no leite (CCS < 550.000 ou > 550.000 cél/mL). Os dados foram analisados através de técnica de análises multivariada (análise fatorial). Observou-se que a elevada contagem de células somáticas influenciou negativamente o rendimento simples e seco do queijo colonial, com maiores perdas de componentes sólidos no soro de queijo. A contaminação dos queijos não esteve relacionada à contaminação da matéria prima. Os queijos não apresentaram padronização quanto à sua composição físico-química, porém podem ser enquadrados dentro das normas estabelecidas para queijos de média umidade.

Palavras-chave: Células somáticas. Qualidade do leite. Queijo colonial. Rendimento industrial.

ABSTRACT

The colonial cheese is produced for decades in the south of Brazil. Historically, it was made by hand with raw milk, but today is made on an industrial scale from pasteurized milk. However, despite the great appreciation and consumption of this cheese, it does not have yet an Identity and Quality Technical Regulation defined by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) from Brazil (MAPA) that establishes norms and standards for their production. The somatic cells are naturally present in milk, but when mastitis occurs- its count increases. Due to mastitis, changes in milk composition happens, like decrease of synthesis of milk components in the mammary gland, decrease of milk yield and passage of blood components to the milk are observed. The objective of this study was to evaluate the influence of somatic cell count (SCC) on industrial yield of colonial cheese and the microbiological and physical-chemical conformity of the cheeses. The study was developed in a dairy plant under federal inspection, in a completely randomized design. Fourteen batches of colonial cheese were produced, with seven repetitions for each of two levels of somatic cells in the raw milk (SCC < 550.000 or SCC > 550.000 cel/mL). Data were analyzed using multivariate analysis technique (factor analysis). It was observed that the high somatic cell count had a negative influence on simple and dried cheese yield of colonial cheese with higher losses of solid component in whey. Contamination of cheese was not related to contamination of the raw milk. Cheeses showed no standardization as to its physical and chemical composition, but the cheeses can be framed within the rules established for average moisture cheeses.

Key-words: Colonial cheese Industrial yield. Milk quality. Somatic cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBT - Contagem bacteriana total
CCS - Contagem de células somáticas
d - Dias
DTA - Doença transmitida por alimento
h - Horas
IN - Instrução normativa
L - Litros
S.I.E - Serviço de Inspeção Estadual
S.I.F - Serviço de Inspeção Federal
S.I.M - Serviço de Inspeção Municipal
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição e CCS do leite cru e rendimento simples de queijo.....50
- Figura 2 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição e CCS do leite cru e rendimento seco de queijo.....52
- Figura 3 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição do soro de queijo, CCS do leite cru e rendimento simples de queijo.54
- Figura 4 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição do soro de queijo, CCS do leite cru e rendimento seco de queijo.....56
- Figura 5 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de enumeração de *Staphylococcus* sp. e coliformes termotolerantes no leite cru e enumeração de *Staphylococcus* sp. e coliformes termotolerantes no queijo colonial.....60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Alterações na composição do leite provocadas pela contagem de células somáticas.28
- Tabela 2 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas e composição do leite cru e rendimento simples de queijo.....49
- Tabela 3 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas e composição do leite cru e rendimento seco de queijo.51
- Tabela 4 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas do leite cru, composição do soro de queijo e rendimento simples de queijo.....53
- Tabela 5 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas do leite cru, composição do soro de queijo e rendimento seco de queijo.....55
- Tabela 6 - Composição do leite cru, de acordo com a contagem de células somáticas (CCS).....57
- Tabela 7 - Estatística descritiva da enumeração de microrganismos mesófilos e psicrotróficos do leite cru, de acordo com seu grupo de contagem de células somáticas.....57
- Tabela 8 - Estatística descritiva da enumeração de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* sp. no queijo, agrupados de acordo com a contagem de células somáticas.58

Tabela 9 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona enumeração de <i>Staphylococcus</i> sp. e coliformes a 45°C no leite cru, com a enumeração <i>Staphylococcus</i> sp. e coliformes a 45°C no queijo... 59	
Tabela 10 - Estatística descritiva das características físico-químicas dos queijos, agrupados de acordo com a contagem de células somáticas. 61	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE – BRASIL E SANTA CATARINA	22
2.2	PRODUÇÃO E CONSUMO DE QUEIJO NO BRASIL	22
2.3	QUEIJO COLONIAL	23
2.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MASTITE..	24
2.5	ALTERAÇÕES NO LEITE E DERIVADOS CAUSADAS PELA CCS.....	27
2.5.1	Efeito da mastite sobre a proteína do leite.....	28
2.5.2	Efeito da mastite sobre a gordura do leite	29
2.5.3	Efeito da mastite sobre a lactose, sódio e cloro.....	29
2.5.4	Efeito da mastite sobre as enzimas	30
2.5.4.1	<i>Atividade proteolítica.....</i>	<i>31</i>
2.5.4.2	<i>Atividade lipolítica.....</i>	<i>31</i>
2.6	IMPACTO DA CCS NOS QUEIJOS	32
2.7	PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE	34
2.8	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE	35
2.9	MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO QUEIJO COLONIAL	37
2.9.1	Coliformes.....	37
2.9.2	Staphylococcus coagulase positiva.....	38
2.9.3	Salmonella sp.....	38
2.9.4	Listeria monocytogenes	39
3	HIPÓTESES	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	INDÚSTRIA, PRODUTORES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
4.2	PRODUÇÃO DOS QUEIJOS E AMOSTRAGEM..	42

4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	43
4.3.1	Leite cru.....	43
4.3.2	Leite pasteurizado	44
4.3.3	Soro de queijo	44
4.3.4	Queijo.....	45
4.3.5	Cálculo do rendimento do queijo	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTORES, PROPRIEDADES E REBANHOS	47
5.2	EFEITO DA CCS SOBRE O RENDIMENTO DE QUEIJO	48
5.3	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO LEITE UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS QUEIJOS.....	57
5.4	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS.....	58
5.5	INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS DO LEITE CRU NO QUEIJO	58
5.6	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS.....	61
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	APÊNDICE A – Termo de consentimento	88
	APÊNDICE B – Questionário.....	91
	APÊNDICE C – Fluxograma do queijo colonial	95
	APÊNDICE D – Análises microbiológicas no leite	97
	APÊNDICE E – Análises microbiológicas no queijo.....	99
	APÊNDICE F – Análise centesimal do queijo	102

1 INTRODUÇÃO

As células somáticas do leite são formadas por células de descamação epitelial natural da glândula e células de defesa do organismo, que migram do sangue para a glândula mamária na tentativa de combater os agentes causadores da mastite.

A redução da contagem de células somáticas (CCS), indicador indireto da qualidade do leite, é uma das grandes prioridades do setor devido as grandes perdas que as mastites subclínicas causam para a cadeia leiteira.

Altas CCS significam prejuízos para os produtores e também para as indústrias, tanto de leite fluído quanto de derivados lácteos. As maiores consequências da utilização de matéria prima com alta CCS são menor vida de prateleira e alterações nas características sensoriais do produto final (TÖPEL, 2004). Para a produção de queijos, além destas, outras alterações indesejáveis podem ocorrer em decorrência da alta CCS como menor rendimento (MATIOLI et al, 2000; COELHO et al, 2014), maior tempo para formação do coágulo de queijo e menor firmeza de coágulo (KLEI et al., 1998).

No sul do Brasil o queijo colonial é um queijo muito apreciado. Trazido pelos imigrantes europeus, é produzido há décadas na região tradicionalmente de forma artesanal. Devido à alta apreciação e apelo cultural, hoje é produzido em escala industrial a partir de leite pasteurizado. Apesar do grande consumo este queijo ainda não possui um regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) que estabeleça normas e padrões para sua produção.

O estudo objetivou avaliar o rendimento industrial, os atributos físico-químicos e microbiológicos de queijos colonial produzidos em uma indústria a partir de leite com dois diferentes níveis de CCS (< 550.000 cels/mL e > 550.000 cels/mL) e avaliar a conformidade dos queijos produzidos à legislação brasileira para queijos de média umidade, em termos de atributos microbiológicos e físico-químicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE – BRASIL E SANTA CATARINA

O Brasil é um expressivo produtor de leite a nível mundial, ocupando a 5ª posição, com um volume 33,3 bilhões de litros produzidos em 2014 (USDA, 2016). Dentre as regiões brasileiras, a região Sul é a maior produtora nacional, representando 34,7% da produção brasileira. Em 2014, Santa Catarina produziu aproximadamente 3 bilhões de litros de leite (IBGE, 2014) e estima-se que a região oeste catarinense represente 75% da produção estadual (EPAGRI/CEPA, 2013).

A cadeia láctea desempenha um papel de grande relevância na produção de alimentos e na geração de emprego e renda para a população brasileira. Acredita-se que existam mais de um milhão e cem mil propriedades rurais que atuam na atividade leiteira no país, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas. Esta atividade chega a ser responsável por 40% dos postos de trabalho no meio rural (CARVALHO et al., 2002).

Em Santa Catarina, a cadeia produtiva de leite está fundamentada por pequenas propriedades rurais e mão de obra familiar, que em 2006 representavam aproximadamente 83,3% da produção estadual (SANTOS, MARCONDES, CORDEIRO, 2006), evidenciando desta forma a importância econômica e social do setor lácteo para o estado.

2.2 PRODUÇÃO E CONSUMO DE QUEIJO NO BRASIL

Segundo estimativas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2015), as queijarias sob Inspeção Federal (S.I.F.) são responsáveis por captar e processar 33 – 34% do volume de leite produzido no país; e o Brasil está produzindo aproximadamente 750 mil toneladas de queijo por ano, em contínuo crescimento (USDA, 2016).

Essa produção de queijo está baseada no baixo consumo deste alimento pelo brasileiro que atualmente é estimado em 3,7 kg/per capita/ano quando comparado a países desenvolvidos como Estados Unidos da América 15,1 kg/per capita/ano e a União Europeia 17,5 kg/per capita/ano (OECD/FAO, 2014). Contudo, segundo as projeções de 2014 a 2023 o Brasil aumentará o consumo interno e a produção nacional tende a crescer significativamente (OECD/FAO, 2014).

2.3 QUEIJO COLONIAL

O queijo colonial, muito apreciado na região sul do Brasil, é um queijo produzido há décadas em algumas regiões do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul por imigrantes europeus de origem italiana e alemã e seus descendentes (LÜBECK et al., 2001).

Preparado tradicionalmente de forma artesanal e com leite cru, hoje, é um queijo produzido a nível industrial partir de leite pasteurizado devido seu alto consumo, pelo apelo cultural e porque é um queijo consumido por todas as faixas etárias e níveis sociais. Encontram-se várias indústrias produzindo queijo colonial no sul do Brasil, geralmente de pequeno porte e com fabricação simples e de baixo custo (ROOS et al., 2005).

Deve-se salientar a diferença entre o queijo colonial e o queijo serrano, sendo o último produzido artesanalmente nos campos de altitude de Santa Catarina e Rio Grande do Sul essencialmente com leite cru, proveniente de bovinos de diversas raças até mesmo não especializadas para leite, alimentados à base de pastagens naturais (CÓRDOVA et al., 2011). Melo et al (2013) avaliaram a inocuidade de 108 amostras de queijos artesanais serrano, produzidos a partir de leite cru. Os autores encontraram inconformidades para com a legislação brasileira com relação aos parâmetros fixados para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, foi

detectada a presença de *Listeria monocytogenes* em três amostras, o que tornava os queijos impróprios para o consumo.

O grande desafio relacionado ao queijo colonial, produzido a partir de leite pasteurizado, está na falta do regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que faz com que ainda não se tenha parâmetros definidos a serem seguidos pelos laticínios. Apesar da inexistência do RTIQ pode-se definir o queijo colonial com as seguintes características: massa semidura, semi-gorduroso, teor médio de umidade, coloração amarelada, ligeiramente ácido, podendo apresentar olhaduras irregulares, apresentando formato retangular ou cilíndrico e casca fina (LÜBECK et al., 2001).

Por ser um queijo de interesse regional, é produzido geralmente por laticínios de pequeno a médio porte, e também é possível encontrar a produção artesanal deste por pequenos produtores que veem nele uma forma de agregar valor a sua produção e gerar uma alternativa de renda para a família.

Deve-se salientar os dados obtidos pelo levantamento realizado pelo Sistema de Informação Gerencial de Inspeção Federal – MAPA (SIGSIF, 2014), onde os três estados do sul do país, juntos, produziram entre 2010 e 2014 mais de 7,1 mil toneladas de queijo colonial, somente em indústrias sob inspeção federal. Deve-se considerar que há uma grande produção de queijo colonial em laticínios sob Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E) e Municipal (S.I.M.) e um grande volume produzido sem inspeção, demonstrando a importância deste queijo para o sul do Brasil.

2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MASTITE

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada por bactérias, algas, fungos filamentosos ou leveduras. A resposta inflamatória da glândula tem por finalidade a eliminação do agente etiológico, a neutralização das toxinas e a regeneração dos tecidos que sofreram injúrias. Pode ser

classificada em clínica, quando os sinais clínicos de inflamação no úbere e alterações macroscópicas do leite são evidentes, ou subclínica, quando na ausência de alterações visuais no úbere e/ou leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite clínica é de fácil detecção por apresentar sinais clínicos visíveis aos produtores (grumos de leite, pus, sangue, dor, aumento de temperatura e vermelhidão do quarto/úbere) e seus prejuízos são causados principalmente devido ao descarte de leite, gastos com antibioticoterapia e descarte precoce dos animais. Contudo, a forma subclínica por não manifestar sinais clínicos, necessita de outros métodos diagnósticos para sua detecção, como a contagem de células somáticas (CCS). A forma subclínica é a que gera maiores prejuízos, devido ao decréscimo da produção na lactação corrente e ao longo das lactações subsequentes, pois a lesão no tecido glandular torna as células secretoras menos eficientes (TRONCO, 2010).

As mastites podem ser classificadas em ambientais e contagiosas de acordo com a etiologia do processo inflamatório. Destas, a mastite contagiosa é a mais importante, por acometer o maior número de animais em produção, principalmente aquelas em que o agente causador é o *Staphylococcus aureus*, provocando a forma subclínica de elevada incidência, alta contagiosidade e alta resistência a antimicrobianos (SANTOS; FONSECA, 2007).

Além da importância econômica para a cadeia leiteira, a mastite tem importância na saúde pública, visto que muitos microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas podem ser veiculadas pelo leite com mastite, podendo causar doenças como salmoneloses, colibaciloses, micobacterioses, yersinioses, listerioses e toxinfecções alimentares causadas pelas toxinas produzidas pelo *Staphylococcus* sp. (FORSYTHE, 2002).

As células somáticas do leite são formadas por células de descamação epitelial natural da glândula e células de defesa do organismo, leucócitos (monócitos, linfócitos e neutrófilos) e macrófagos, que migram do sangue para a glândula mamária na tentativa de combater os agentes causadores da mastite (PHILPOT; NICKERSON, 1991; KEHRLI; SHUSTER, 1994; PILLAI et al., 2001; SHARMA et al., 2011; BARATTA et al., 2015).

O leite de um quarto sadio geralmente apresenta CCS inferior a 100.000 células/mL, enquanto que um quarto infectado aumenta gradativamente este valor, podendo ultrapassar 1.000.000 células/mL em alguns casos (SANTOS; FONSECA, 2007). Desta forma, a CCS do leite de uma vaca indica quantitativamente o grau de infecção da glândula mamária, enquanto que a CCS do leite do tanque de resfriamento indica o grau de incidência média de mastite do rebanho (MACHADO et al., 2000).

A técnica de contagem de células somáticas (CCS) no leite é uma metodologia moderna de diagnóstico de mastite. É apreciada internacionalmente como critério de avaliação da sanidade da glândula mamária individual (AKERS; NICKERSON, 2011), por animal e, desta forma da qualidade do leite produzido por este, ou avaliação da sanidade do rebanho, através do exame do tanque de resfriamento do leite (RUEGG, 2006). A CCS pode ser determinada utilizando-se a citometria de fluxo. Nesta análise, existe um contador eletrônico de células somáticas em que as amostras de leite têm os núcleos das células coradas e expostas a um raio laser, refletindo luz vermelha (fluorescência) e os sinais são transformados em impulsos elétricos detectados por um fotomultiplicador e transformados em número de células/mL (BRASIL, 2003).

2.5 ALTERAÇÕES NO LEITE E DERIVADOS CAUSADAS PELA CCS

O leite é formado por substâncias sintetizadas na própria glândula mamária e de outros compostos que provém da circulação sanguínea para os alvéolos glandulares (TRONCO, 2010). O processo inflamatório - mastite - causa redução da atividade secretora da glândula mamária, afetando o volume e a composição do leite produzido (VERDI et al., 1987; BOLAND et al., 2013). Alta CCS está sempre relacionada negativamente sobre a qualidade do leite cru, uma vez que diminui a produção, altera a densidade, pode impedir o adequado processamento industrial e é um risco para a higiene do leite por possivelmente conter microrganismos patogênicos devido à inflamação (HARMON, 1994).

As mais diversas alterações são observadas no leite cru em consequência da resposta inflamatória provocada pela mastite. Podem ocorrer mudanças nas concentrações tanto dos principais componentes - proteína, gordura e lactose - quanto dos componentes encontrados em menores níveis no leite - minerais e enzimas - (KITCHEN, 1981; HARMON 1994, SCHALLIBAUM, 2001). Estas mudanças na composição do leite ocorrem por dois motivos, devido à redução na síntese de componentes do leite na glândula mamária (proteína, gordura e lactose) e pelo aumento da permeabilidade vascular (decorrência do processo inflamatório) resultando em aumento do influxo de componentes da corrente sanguínea para o leite, conforme é possível observar na Tabela 1. A intensidade das alterações no leite vai depender da severidade da infecção e do estágio da doença (SCHALLIBAUM, 2001).

Tabela 1 – Alterações na composição do leite provocadas pela contagem de células somáticas.

Alteração na composição do leite (g/100 mL)	CCS (x 1000 cel/mL)				Razão da Mudança
	<100	<250	500-1000	>1000	
Lactose	4,90	4,74	4,60	4,21	Redução da síntese
Caseína	2,81	2,79	2,65	2,25	
Gordura	3,74	3,69	3,51	3,13	
Proteínas do soro	0,81	0,82	1,10	1,31	Passagem do sangue
Soroalbuminas	0,02	0,25	0,23	0,35	
Imunoglobulinas	0,12	0,14	0,26	0,51	
Cloro	0,09	0,09	0,12	0,14	
Sódio	0,05	0,06	0,09	0,10	
Potássio	0,17	0,18	0,13	0,15	
pH	6,6	6,6	6,8	6,9	

Fonte: Adaptado de Schallibaum, 2001.

2.5.1 Efeito da mastite sobre a proteína do leite

O impacto da CCS sobre a proteína total do leite é variável, pois ocorre a manutenção dos níveis de proteína ou mudanças muito pequenas. Isso acontece porque apesar da síntese das proteínas das células epiteliais da glândula mamária (α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina e β - lactoglobulina) estar diminuída ocorre o aumento do influxo das proteínas plasmáticas (imunoglobulinas e soroalbuminas) (AULDIST; HUBBLE, 1998).

Durante a mastite, a síntese de caseína é normalmente diminuída (KITCHEN, 1981; VERDI et al., 1987; MAZAL et al., 2007). Isso pode ser explicado possivelmente pela redução na capacidade de síntese e secreção da caseína pelo epitélio glandular que está lesionado pelas toxinas bacterianas (OLIVER; CALVINHO, 1994). Entende-se então que, durante

a mastite, a proporção caseína:proteína total é diminuída (VERDI et al., 1987; MA et al., 2000; MAZAL et al., 2007). A manutenção dos níveis de proteína, portanto, são mantidos, mesmo que desta forma sejam maiores os teores de nitrogênio não-caseinoso, devido ao aumento da concentração de proteínas séricas no leite, possivelmente pela perda da integridade do epitélio glandular durante a mastite (PAAPE et al., 1995; AULDIST, 2000).

2.5.2 Efeito da mastite sobre a gordura do leite

No leite a gordura é encontrada sob a forma de emulsão de glóbulos de gordura no soro. Essa emulsão é responsável pelos ácidos graxos essenciais do leite e contribui para uma melhor palatabilidade do produto (TRONCO, 2010).

Da mesma forma que ocorre com a proteína, o impacto da CCS sobre a gordura do leite também é variável. Pode-se observar redução (POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988a; AULDIST et al., 1996), aumento (COONEY et al., 2000, MA et al., 2000) ou não alteração na concentração de gordura (POLITIS; NG KWAI HANG, 1988b; ANDREATTA et al., 2007), dependendo do volume de leite produzido (MUNRO et al., 1984). A concentração total de gordura do leite normalmente encontra-se reduzida quando em alta CCS comparando-se com baixas CCS, uma vez que a mastite interfere com a habilidade da glândula mamária de sintetizar e secretar a gordura (KITCHEN, 1981; MUNRO et al., 1984; AULDIST, 2000).

2.5.3 Efeito da mastite sobre a lactose, sódio e cloro

As alterações das concentrações destes elementos ocorrem, principalmente, devido aos danos do epitélio da glândula mamária, que quando inflamado não regula adequadamente as trocas entre o lúmen alveolar e a circulação

sanguínea, permitindo a livre passagem dos componentes. As concentrações de sódio e cloro aumentam no leite com alta CCS, enquanto as de cálcio, potássio e lactose diminuem (ROGERS et al., 1989).

A concentração de lactose em leite proveniente de vacas com mastite é menor comparado ao leite de vacas sadias, isso porque a inflamação da glândula mamária resulta em diminuição da síntese de lactose (AULDIST et al., 1995; COONEY et al., 2000; VIANNA et al., 2008) e provavelmente porque aproximadamente 66% do cálcio presente no leite está associado às micelas de caseínas, sendo assim, quando ocorre redução do teor de cálcio durante a mastite essa redução pode estar relacionada à redução do teor de caseína. A elevação da concentração de sais, sódio e cloro, possivelmente desencadeia durante a mastite o aumento da pressão osmótica do leite. Assim, esse aumento pode ser compensado pela redução na concentração de lactose (FOX et al., 2000) que por via paracelular passa da glândula para o sangue e urina (AULDIST, 2000).

2.5.4 Efeito da mastite sobre as enzimas

O leite bovino normal possui cerca de 70 tipos de enzimas endógenas (FOX, 2003) e essas podem ter origem sanguínea, das células epiteliais da glândula ou leucocitária. As enzimas podem ser encontradas na fase sérica do leite, associadas às micelas de caseína, à membrana dos glóbulos de gordura ou às partículas microsossomais (FOX; KELLY, 2006). Durante a mastite, a concentração e/ou atividade das enzimas encontra-se aumentada, em especial das enzimas originadas do sangue e dos leucócitos (KITCHEN, 1981).

A interferência da mastite sobre a atividade enzimática no leite é de grande importância para a indústria láctea, em especial as atividades proteolíticas e lipolíticas. Enzimas com capacidade de proteólise podem reduzir o rendimento de

queijos visto que afetam significativamente a caseína, e as enzimas com capacidade lipolítica interferem no sabor dos derivados, pelo aumento nos níveis de ácidos graxos livres no leite, provocando sabor rançoso (MAZAL et al., 2007).

2.5.4.1 Atividade proteolítica

A caseína é a principal proteína que sofre ação das enzimas proteolíticas no leite, devido à sua alta concentração e alta susceptibilidade, sendo as proteínas do soro mais resistentes à proteólise (VERDI et al., 1987). A proteólise no leite pode ter origem de enzimas endógenas, como a plasmina ou de proteases dos leucócitos presentes no leite (VERDI; BARBANO, 1988).

A principal enzima proteolítica endógena no leite é a plasmina e normalmente está associada à fração de caseína. O seu precursor, o plasminogênio, também se encontra no leite e pode ser ativado e convertido em plasmina (RHAM; ANDREWS, 1982; FOX; KELLY, 2006). A plasmina é responsável por 90% da proteólise total no leite (BARRY & DONNELLY, 1981). Quando a CCS do leite é elevada, a atividade proteolítica aumenta, pois as células somáticas possuem a capacidade de conversão do plasminogênio em plasmina, resultando em proteólise da caseína (BARBANO et al., 1991; ISMAIL; NIELSEN, 2010).

Outra forma de atividade proteolítica no leite é quando a contagem bacteriana (CBT) é elevada, nesse caso os microrganismos psicrotóxicos produzem proteases extracelulares que são liberadas no leite e contribuem significativamente à degradação de proteínas (COUSIN, 1982; ISMAIL; NIELSEN, 2010).

2.5.4.2 Atividade lipolítica

A lipólise no leite ocorre principalmente pela ação da enzima endógena, a lipase lipoprotéica do leite (LLP), e

também de outras enzimas com atividade lipolítica, as quais podem ter origem das células somáticas, dos microrganismos e de outras esterases (AZZARA; DIMICK, 1985; FOX; KELLY, 2006).

A hidrólise enzimática da gordura do leite - lipólise - diminui a vida de prateleira e prejudica sensorialmente o leite e seus derivados. As lipases de origem das células somáticas danificam a membrana dos glóbulos de gordura e expõem os triglicerídeos à ação de lipases naturais do leite (AULDIST; HUBBLE, 1998) surgindo o sabor ranço. O leite com alta CCS, mesmo após o tratamento térmico, apresenta alta atividade lipolítica; contudo, as causas dessa alta atividade lipolítica não estão esclarecidas, porque esse aumento poderia ter origem nas próprias células somáticas, lipases do sangue e da LLP (SANTOS et al., 2007). Da mesma forma, que ocorre com a proteólise, a lipólise também pode ter origem na alta CBT, em especial pelas bactérias psicotróficas (CHEN et al., 2003).

2.6 IMPACTO DA CCS NOS QUEIJOS

O leite normal, oriundo de vacas sadias, após a ordenha, encontra-se em equilíbrio físico-químico. O processo inflamatório provoca alterações neste equilíbrio afetando a estabilidade do leite, suas características sensoriais e as propriedades tecnológicas. Estas mudanças do leite com alta CCS estão diretamente relacionadas à alteração do perfil enzimático do leite, como é possível observar nos defeitos de sabor como ranço e amargo que são resultado da atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas sobre a proteína e a gordura do leite; e a redução do rendimento de produtos à base proteica (queijos e iogurtes) que está relacionada à degradação da caseína por enzimas proteolíticas. Esses produtos de base proteica dependem essencialmente da caseína, e quando em mastite, a síntese desse composto é reduzida e sua hidrólise é aumentada (GIGANTE; COSTA, 2008).

O alto nível de células somáticas na matéria prima utilizada para fabricação de queijos é um tema continuamente estudado, devido sua importância econômica sobre o rendimento e a qualidade dos queijos. Demonstraram-se as mais diversas alterações que podem ocorrer, como: aumento do tempo de coagulação do leite (ROGERS; MITCHELL, 1994; KLEI et al., 1998;), diminuição da firmeza do coágulo formado (POLITIS; NG KWAI HANG, 1988a; KLEI et al., 1998; KELLY; MCSWEENEY, 2002; LE ROUX et al., 2003), maior perda de componentes do leite para o soro (POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988a; BARBANO et al., 1991), menor rendimento (GRANDISON, 1986; POLITIS; NG KWAI HANG, 1988b; MATIOLI et al., 2000; LE ROUX et al., 2003 COELHO et al., 2014) e alterações de características organolépticas e de textura (MUNRO et al., 1984; AULDIST et al., 1996a; POPESCU; ANGEL, 2009).

O efeito da mastite sobre as características de produção de queijo cheddar foi estudado por Kelly e Mcsweeney (2002) e os autores relataram que houve aumento da atividade das enzimas antimicrobianas, lactoferrina, lactoperoxidase e plasmina, que são capazes de inibir a multiplicação dos microrganismos utilizados na cultura láctea. Nesse mesmo trabalho, através de microscopia confocal, foi observado que a matriz proteica do gel formado era extremamente frágil, o que possibilitava a perda de caseína, gordura e sólidos totais para o soro, reduzindo assim a firmeza do coágulo.

Com relação ao rendimento, Politis e Ngkwai-Hang (1988b) estudaram o queijo cheddar e observaram que num aumento de CCS de 100 mil cel/mL para 900 mil cel/mL ocorria um decréscimo de 11% no rendimento do queijo. O queijo cottage quando produzido com CCS superior a 800 mil cel/mL foi estudado por Klei et al. (1998) que afirmaram que o rendimento do queijo cottage reduziu 4,34%. Matioli et al. (2000) avaliando o rendimento de queijos Minas Frescal produzidos com leite com CCS \geq 600 mil cel/mL comparado a

CCS < 200 mil cel/mL obtiveram um decréscimo de 9,81 %. Coelho et al. (2014) encontraram valores ainda maiores, 18,3% de redução no rendimento quando os queijos muçarela eram elaborados com leite de maior CCS, comparando grupos ≤ 200 mil cel/mL e >750 mil cel/mL.

Uma importante modificação, decorrente da alta CCS na matéria prima dos queijos está na umidade. Mazal et al. (2007) observaram que pode ocorrer a inibição da cultura lática pelos fatores antimicrobianos produzidos pelos leucócitos presentes, impedindo que o pH da massa se altere, processo necessário para a adequada sinérese da massa, o que resultou em queijo prato com umidade 2% maior que os de baixa CCS. Da mesma forma, ocorreu com outros autores, que também encontraram maiores teores de umidade em queijos produzidos com leite de alta CCS (JAEGGI et al., 2003; VIANNA et al., 2008). A alta umidade nos queijos aumenta a atividade de água para os microrganismos e pode desta forma reduzir a vida de prateleira destes produtos, devido à deterioração precoce.

2.7 PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE

Visando minimizar as perdas pela falta de qualidade, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite - PNMQL - com a legislação vigente no país hoje, Instrução Normativa (IN) nº 62, substituindo a antiga IN nº 51, estabelece: limites máximos de CCS e CBT nas diferentes regiões do Brasil.

Desde julho de 2015 os produtores já devem estar produzindo leite com no máximo 500.000 células/mL. A IN nº 62 prevê ainda a redução para 400.000 células/mL, igualando-se aos limites de CCS da União Europeia, Austrália e Nova Zelândia (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1997; HILLERTON, 1999) para as regiões sul, sudeste e centro-oeste

a partir de julho de 2016 e para as demais regiões a redução passa a valer a partir de julho de 2017 (BRASIL, 2011).

Da mesma forma, a qualidade microbiológica também é preconizada através da CBT, onde os limites válidos hoje são: 300.000 UFC/mL para todas as regiões do Brasil, sendo que a partir de 01/07/16 para as regiões sul, sudeste e centro-oeste e 01/07/17 para as regiões norte e nordeste o limite máximo passa a ser de 100.000 UFC/mL.

O tempo de armazenamento do leite nas propriedades rurais também é determinado pela IN n° 62: até 48 horas de armazenamento, sob refrigeração, na propriedade até ser captado pela indústria (BRASIL, 2011). Reche et al. (2015) demonstraram que, quando o leite é armazenado em condições adequadas em tanques de expansão, a qualidade microbiológica do leite se mantém estável durante o período de armazenamento permitido pela IN n° 62/2011. A implementação do resfriamento do leite nas propriedades leiteiras minimizou os problemas relacionados às bactérias mesófilas, pois inibiu sua multiplicação e, desta forma, a deterioração do leite. Contudo, essa medida pode favorecer a multiplicação de microrganismos psicrotóxicos (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009). As bactérias psicrotóxicas produzem enzimas extracelulares proteolíticas e lipolíticas resistentes ao tratamento térmico empregado pela indústria, e por isso, geram alterações no rendimento industrial, sensoriais e na vida de prateleira dos produtos lácteos (ARCURI, 2008).

2.8 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

A legislação brasileira define leite como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). Existem três potenciais fontes de contaminação do leite: a superfície dos tetos, o equipamento de ordenha e no próprio interior do úbere quando com mastite. Depois da ordenha, o armazenamento do leite, a capacidade de

refrigeração do tanque, a adequada manutenção da temperatura e o tempo de armazenamento do leite é que determinam a capacidade de multiplicação dos microrganismos contaminantes (SLAGHUIS, 1996).

Desde a IN 51 (BRASIL, 2002), é exigida a refrigeração do leite cru na propriedade para conservá-lo até o carregamento pelo transporte a granel. Essa exigência reduziu as deteriorações causadas por bactérias mesófilas no leite cru, mas favoreceu a seleção de bactérias psicrótróficas que causam grandes prejuízos na indústria (STEPANIAK, 2004).

As bactérias mesófilas são fermentadoras de lactose, e previamente à refrigeração do leite, elas eram o maior desafio, pois acidificavam rapidamente o leite quando não refrigerado (ARCURI, 2003). Esses microrganismos são capazes de se multiplicar numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, tendo como temperatura ótima de crescimento 32 °C. Essas temperaturas são as encontradas nas temperaturas ambientes de países de clima tropical (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Outra grande importância das mesófilas é que neste grupo estão os microrganismos deteriorantes e os patógenos (JAY, 2005).

As bactérias psicrótróficas têm distribuição ubiqüitária no ambiente. A sua contagem no leite está relacionada com as condições sanitárias de obtenção. Em condições ideais encontra-se menos de 10% da microbiota total como sendo psicrótrófica, mas em condições não ideais de sanidade elas podem representar até 75% do total dos microrganismos presentes no leite (NIELSEN, 2002).

Os maiores problemas que as psicrótróficas podem causar nos queijos são sabores indesejáveis e redução no rendimento de fabricação (BANKS et al., 1988; CROMIE, 1992). Isso ocorre devido às proteases e lipases produzidas pelas psicrótróficas que são termoresistentes. Shah (1994) e Muir (1996) relataram que as proteases e lipases podem possuir atividade residual superior a 60% após a pasteurização e de 20

% após o tratamento de ultra alta temperatura (UHT), por isso a preocupação com a presença desses microrganismo no leite utilizado para a fabricação de queijos, em especial os de longa maturação, onde defeitos sensoriais exacerbam.

2.9 MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO QUEIJO COLONIAL

Devido à inexistência de um regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) para o queijo colonial, pode-se apenas classificar este queijo de acordo com a Portaria n° 146 (BRASIL, 1996) como um queijo semi-gorduroso (25,0 a 44,9% de gordura) e de média umidade (36% a 45,9%) e a partir desta classificação seguir os parâmetros físico-químicos e microbiológicos existentes e exigidos para esta classe de alimento.

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 12 (BRASIL, 2001) que aprova o regulamento técnico para os padrões microbiológicos dos alimentos, estabelece que em 25 g de queijo de média umidade, numa análise indicativa, deve-se ter como parâmetros microbiológicos: ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e limite máximo de 1000 UFC/g para coliformes a 45 °C, sendo o mesmo limite para o *Staphylococcus* coagulase positivo.

2.9.1 Coliformes

Os coliformes são bastonetes Gram-negativos, não-esporeados, que fermentam a lactose dentro de 48 h e produzem gás. São representados por quatro gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Escherichia* (JAY, 2005). Esses quatro gêneros formam o grupo dos coliformes a 35 °C, sendo somente o gênero *Escherichia* de origem entérica de humanos e animais de sangue quente. Já o grupo dos coliformes a 45 °C, anteriormente chamados de fecais, é um subgrupo do anterior e

surgiu por selecionar apenas bactérias de origem fecal (*E. coli*), mas hoje, sabe-se que microrganismos de origem não fecal também podem se desenvolver neste meio (SILVA et al., 2010).

Esses microrganismos quando presentes nos alimentos, em determinadas quantidades, podem indicar contaminação de origem fecal e possível presença de patógenos e/ou deteriorantes, ou seja, indicam as condições higiênicas da fabricação/manipulação do alimento (JAY, 2005).

2.9.2 *Staphylococcus coagulase positiva*

O *Staphylococcus coagulase positiva* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo, catalase positivo e distingue-se dos demais *Staphylococcus* por ser positivo no teste da coagulase. O representante, *S. aureus*, é uma bactéria patogênica, não resistente ao calor e por isso é facilmente destruído na pasteurização. Entretanto, é uma bactéria produtora de toxinas termoestáveis. Por essa característica, o *S. aureus* é classificado como causador de doença transmitida por alimentos (DTA) no grupo III pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (2002), sendo que o grupo apresenta perigo moderado, de curta duração e sem ameaça de morte e sequelas, com sinais auto limitados, mas com severo desconforto (SILVA et al., 2010).

2.9.3 *Salmonella* sp.

A *Salmonella* sp. é uma bactéria que pertence à família das enterobacteriáceas. São bacilos não esporulados, que possuem flagelos na sua maioria, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose e outros açúcares e descarboxilam aminoácidos. As bactérias do gênero *Salmonella* são comumente responsáveis por toxinfecções em humanos (JAY, 2005). Segundo a *International Commission*

on *Microbiological Specifications for Foods* (2002) a DTA causada por essa bactéria é classificada como categoria 12, doença branda, de risco grave e difusão extensa. A contaminação dos alimentos por esta bactéria pode ocorrer devido ao controle inadequado de temperatura, manipulação incorreta ou contaminação cruzada (FORSYTHE, 2002).

2.9.4 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, hemolítico em ágar sangue e oxidase positivo (BRACKETT, 1988). É responsável por graves surtos de listeriose, tanto em humanos quanto animais. Pode ser a responsável também por casos de meningite, septicemia e aborto (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Esse microrganismo tem como característica a capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e a relativa resistência térmica (ICMSF, 1996). Muitos surtos de listeriose estão relacionados à ingestão de produtos lácteos (GUERRA; BERNARDO, 2004).

3 HIPÓTESES

O rendimento industrial do queijo colonial é influenciado pela contagem de células somáticas (CCS) do leite utilizado como matéria prima, sendo que leite com $CCS > 550.000$ cels/mL apresentará menor rendimento de queijo colonial comparado ao leite com $CCS < 550.000$ cels/mL.

O teor de sólidos do leite cru influencia diretamente o rendimento industrial do queijo colonial.

O soro de queijo de lotes fabricados com leite com $CCS > 550.000$ cels/mL apresentará maiores quantidades de sólidos (gordura, proteína, caseína) comparado ao soro de queijo de lotes fabricados com leite com $CCS < 550.000$ cels/mL.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INDÚSTRIA, PRODUTORES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi conduzido durante os meses de abril a maio de 2015, em uma indústria de laticínios localizada na microrregião de Concórdia, no oeste de Santa Catarina. A indústria parceira onde foram produzidos os queijos, encontrava-se sob vigilância do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.).

Dois grupos de produtores fornecedores de leite ao laticínio foram formados de acordo com a realidade possível na indústria, sendo um grupo com baixa CCS (≤ 550.000 cels/mL) e outro com alta CCS (≥ 550.000 cels/mL), limites estes estabelecidos através da média geométrica de CCS de tanque dos produtores dos últimos três meses antes do início do projeto. O histórico dos produtores, para a formação dos dois grupos, fornecido pela indústria, a partir das amostras de leite analisadas em atendimento ao estabelecido pela IN 62/2011.

As propriedades leiteiras foram caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado (Apêndice B), devidamente autorizado pelos produtores (Apêndice A), sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UDESC sob o nº referência 38773214.0.0000.0118 na Plataforma Brasil – Ministério da Saúde, abordando situação sócio-econômica dos produtores, caracterização da propriedade e do rebanho, sanidade do rebanho, método e higiene de obtenção do leite, conservação e comercialização do leite.

Para cada grupo de produtores (alta e baixa CCS) foram produzidos sete lotes de queijos colonial na indústria parceira, em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e sete repetições. Durante a elaboração dos queijos foram coletadas amostras de leite cru (diretamente da recepção do caminhão), leite pasteurizado (imediatamente após o tratamento térmico), soro de queijo e foi feito o

acompanhamento de toda a produção até a maturação completa dos queijos (15 dias), quando foram coletadas amostras de queijo, sendo duas unidades de cada lote.

4.2 PRODUÇÃO DOS QUEIJOS E AMOSTRAGEM

O leite de cada grupo era armazenado separadamente, nos compartimentos do caminhão isotérmico que fazia a captação e transporte do leite das propriedades para a indústria, respeitando a legislação brasileira para até 48 h de armazenamento na propriedade rural. Na recepção deste caminhão na indústria, uma amostra do leite cru era coletada diretamente de cada compartimento, após homogeneização. O leite seguia para a pasteurização (72 – 75 °C durante 15 – 20 segundos) em pasteurizador a placas com capacidade para 6 mil L/h. O leite de cada grupo (alta ou baixa CCS) era pasteurizado isoladamente, não havendo mistura com o restante do leite da indústria.

O leite pasteurizado seguia diretamente para o tanque de produção do queijo colonial. Este tanque era retangular, de inox, camisa dupla, com capacidade para 2000 L. Foram utilizados, em média, 1350 L de leite por lote, sendo o queijo fabricado com adição de fermento láctico (BV DEX - 06[®]), cloreto de cálcio, corante natural de urucum (Urucum BV R25[®]) e coalho (Coalho líquido BV[®]), como é possível observar no fluxograma de produção do queijo colonial no apêndice C. Ao atingir o ponto, seguia-se com o corte manual por liras, sendo uma amostra de soro coletada após o corte da massa. Prosseguia-se com a enformagem, prensagem e salmoura (tanques exclusivos para lotes de queijo colonial), secagem (4 dias – 6 °C), embalagem e maturação (10 d). Ao completar o período de maturação, e alcançar o 15^o dia de fabricação, os queijos eram transportados ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense – IFC/Câmpus Concórdia para as análises e físico-químicas. Amostras de cada queijo eram enviadas ao Laboratório de

Análises Físico-Químicas (LAFQ) da Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia / SC para liofilização das amostras e realização dos ensaios de composição centesimal.

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

4.3.1 Leite cru

Três amostras de leite cru eram coletadas para cada grupo (CCS < 550.000 cels/mL ou CCS > 550.000 cels/mL), sendo uma em frasco contendo conservante Bronopol[®] (amostra para físico-químico) e outra com conservante Azidiol[®] (microbiológico), as quais eram enviadas ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Alimentos (CIDASC/UnC), credenciado à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), conservadas com gelo reciclável em caixa isotérmica, para as análises de: composição centesimal (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína) por equipamento automatizado por infravermelho (Bentley Combisystem, Bentley Instruments[®], Inc., U.S.A), seguindo as recomendações de International Dairy Federation (IDF) 141 C; contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Delta Combiscope, Advanced Instruments[®], Inc., U.S.A) e contagem bacteriana total por citometria de fluxo (Bentley Bactocount IBC, Bentley Instruments[®], Inc., U.S.A), seguindo o protocolo para Leite cru ISO 13366-2/International Dairy Federation (IDF) 148-2 e Leite cru ISO 13366- 2/International Dairy Federation (IDF) 148-2, respectivamente.

A terceira amostra de leite cru era coletada em frasco estéril sem adição de conservante, a qual era transportada adequadamente refrigerada para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense – IFC/Câmpus Concórdia, onde procediam-se as análises microbiológicas, de acordo com a metodologia na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003). As análises realizadas eram: enumeração de aeróbios mesófilos, coliformes a 35 °C e 45 °C,

contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e enumeração de microrganismos psicrotróficos, sendo esta última pela metodologia descrita pela APHA 2001. Inicialmente eram realizadas diluições seriadas da amostra, e posteriormente o plaqueamento feito em duplicata. As análises estão descritas no apêndice D.

Análises laboratoriais de rotina da recepção de leite na indústria forneciam os dados de acidez Dornic e densidade do leite, esta calculada pelo disco de Ackermann corrigida para 15 °C. Testes para detecção de antibióticos também eram realizados. Nenhuma amostra apresentou-se fora dos padrões da legislação brasileira.

4.3.2 Leite pasteurizado

Uma amostra do leite pasteurizado era coletada do tanque, previamente à produção do queijo, imediatamente após a pasteurização, em frasco estéril e sem conservante, mantida sob refrigeração e devidamente armazenada até o momento do processamento. Uma alíquota era enviada ao laboratório CIDASC/UnC, para análise da composição centesimal e contagem de células somáticas, como descrito anteriormente.

A amostra de leite acondicionada em frasco estéril era imediatamente coletada após a pasteurização e direcionada para o Laboratório IFC, onde procedia-se a realização das análises de enumeração de coliformes a 35 °C e a 45 °C, contagem de mesófilos aeróbios (BRASIL, 2003) e contagem de microrganismos psicrotróficos (APHA, 2001) após as diluições seriadas. O plaqueamento era feito em duplicata. Análises realizadas no leite pasteurizado são válidas para as análises descritas no apêndice D, para leite cru.

4.3.3 Soro de queijo

Uma amostra de soro de queijo era coletada ao final da produção, no tanque, para avaliar a composição centesimal (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína) por equipamento automatizado por infravermelho no laboratório da CIDASC/UnC. No laticínio também eram realizadas as análises de densidade pelo disco de Ackermann, gordura e acidez Dornic, durante o acompanhamento da produção.

4.3.4 Queijo

Os queijos ao 5° dia de fabricação eram embalados a vácuo, e ficavam armazenados em câmara fria, a 6 °C até completarem 15 dias de fabricação, período de maturação em câmara fria necessário para que o queijo estivesse apto para a comercialização. Ao 15° dia eram enviados do laticínio para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos - IFC/Concórdia, em caixas isotérmicas com gelo reciclável. Prosseguiram-se as seguintes análises descritas no apêndice E, de acordo com Brasil (2003): coliformes a 35 °C e 45 °C, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* (SILVA et al., 2001), sendo estas de exigência da legislação brasileira para queijos de média umidade que constam na RDC n° 12 (BRASIL, 2001).

Para a realização das análises de composição centesimal dos queijos, as amostras foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Análises Físico-Químicas (LAFQ) da Embrapa Suínos e Aves, localizado em Concórdia / SC, armazenadas em caixas isotérmicas. Previamente aos ensaios físico-químicos foi realizada a liofilização das amostras, em um liofilizador LJI-030® (JJ Científica, São Carlos, SP, Brasil). Tanto a liofilização quanto as demais análises estão descritas, de acordo com a sua metodologia preconizada, no apêndice F: matéria seca, umidade, extrato etéreo, matéria mineral, proteína bruta, nitrogênio total, energia bruta e elementos minerais.

4.3.5 Cálculo do rendimento do queijo

O rendimento era calculado de duas maneiras: a) rendimento simples - o volume em litros de leite necessário para a elaboração de quilogramas de queijo (L/kg), dividindo-se o volume de leite utilizado pela soma da massa dos queijos obtidos; b) rendimento seco - a massa em gramas de sólidos totais de queijo por litro de leite (g ST/L). Para tanto, empregou-se a equação de Furtado (2005):

$$R(\text{g ST / L}) = \frac{P \times \text{ST}}{V}$$

Onde: R = rendimento; P = quilos de queijos obtidos; ST = porcentagem de extrato seco dos queijos; V = volume de leite utilizado.

O rendimento simples da fabricação do queijo (L/kg) era calculado ao 5º dia após a fabricação, no momento da embalagem, após a secagem (4 dias – 6 °C).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido ao grande número de variáveis não controladas que poderiam estar afetando a produção e o rendimento dos queijos, os dados obtidos foram analisados através de técnica de análises multivariada (análise fatorial), utilizando-se o pacote estatístico SAS® (SAS INSTITUTE, 2002), sendo os dados previamente padronizados pelo procedimento STANDARD e a análise fatorial realizada utilizando o procedimento FACTOR, com rotação Promax. Os níveis de CCS foram codados com 0 (CCS < 550.000) e 1 (CCS > 550.000).

Os fatores 1 e 2 nas tabelas descritas a seguir representam a dimensão em que as variáveis se encontram (1ª ou 2ª dimensão). Nos fatores encontram-se as relações positivas ou contrárias entre as variáveis utilizadas nas análises, sendo superior ou inferior a 0,4 o valor mínimo para a existência da relação e as comunalidades demonstram a relevância de cada variável.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTORES, PROPRIEDADES E REBANHOS

Participaram do projeto doze propriedades leiteiras e a partir do questionário guia semi-estruturado caracterizou-se o perfil sócio-econômico, o rebanho e os métodos de obtenção, conservação e comercialização do leite dos participantes.

Praticamente a totalidade, 92% das propriedades, se enquadrava como pequena propriedade rural (de 1 a 4 módulos rurais ou até 60 hectares), habitando em média 4,5 pessoas por propriedade. A maioria destas propriedades (83%) possuía até 15 animais em lactação, sendo que dois rebanhos possuíam mais de 40 animais em lactação. A raça predominante era a Holandesa, seguida pela raça Jersey e por animais mestiços.

A grande maioria dos produtores, 92%, trabalhava na atividade leiteira há mais de 10 anos, sendo que em 75% do total das propriedades a produção de leite era a principal fonte de renda. Trabalhavam em média na atividade 2,5 pessoas por propriedade, sendo a responsabilidade da ordenha, em 66% dos casos da esposa. Em 67% das propriedades a produção diária de leite era igual ou inferior a 100 L, gerando uma renda de até 2 salários mínimos em 44% das propriedades, de 2 a 3 salários mínimos em 33% das propriedades e superior a 4 salários mínimos nas demais.

Os produtores em sua maioria (75%) possuíam ensino fundamental incompleto e os demais possuíam ensino fundamental completo ou ensino médio.

Os produtores efetuavam a ordenha em ordenhadeira mecânica canalizada em 58% das propriedades e 25% realizavam ordenha balde ao pé tradicional. As demais realizavam a ordenha mecânica balde ao pé ou com transferidor. Somente 25% dos produtores realizavam manutenção periódica dos equipamentos de ordenha, sendo que 17% não realizavam qualquer tipo de manutenção e os demais

somente quando necessário. O leite era refrigerado em tanques de expansão direta em 67% das propriedades e por imersão nas demais. O leite era armazenado por até 48 h nos resfriadores, exceto em uma propriedade em que o leite era coletado diariamente.

No manejo da ordenha 83% dos produtores adotavam a prática de lavar o teto, 17% lavavam também o úbere, 33% utilizava toalha de pano para secar o teto, e somente 25% empregava *pré-dipping* como método de higienização das tetas para a ordenha, enquanto 42% realizavam *pós-dipping*, sendo estas técnicas indicadas para a prevenção de mastites ambientais e contagiosas, respectivamente. Para o diagnóstico de mastite no momento da ordenha, 25% dos produtores afirmou não realizar qualquer tipo de teste, 58% fazia o teste da caneca de fundo preto quando achava necessário e 17% fazia o teste da caneca de fundo preto diariamente, sendo que outros testes não eram realizados.

A caracterização das propriedades e obtenção desses resultados demonstram a fragilidade da cadeia produtiva leiteira desta região de Concórdia, baseada essencialmente em pequenos produtores rurais. Estes, em sua grande maioria, têm na atividade leiteira a principal renda, mas produzem leite com baixo grau de especialização ou utilizando práticas pouco adequadas, resultando em baixa produção e/ou produto de qualidade questionável.

5.2 EFEITO DA CCS SOBRE O RENDIMENTO DE QUEIJO

Em média foram necessários 8,72 L de leite para produzir um kg de queijo ou 16,13 L para produzir um kg de matéria seca de queijo. Dentro dos limites estabelecidos de células somáticas para os dois grupos, os valores médios de CCS para o grupo de baixa foi de 373 mil células/mL e para o grupo de alta CCS foi de 652 mil células/mL.

Uma análise fatorial em que foram relacionadas a CCS do leite cru em duas classes (acima ou abaixo de 550 mil

células/mL) com a composição do leite cru e o rendimento simples de queijo (L de leite/kg de queijo produzido) demonstrou que existe relação entre a CCS, o rendimento simples e os componentes sólidos do leite. A soma dos dois primeiros fatores explicou 73,14% da variação total, sendo que a relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada numericamente e graficamente na Tabela 2 e Figura 1, respectivamente.

No fator 1 observa-se a relação positiva entre os teores de gordura, proteína e lactose do leite cru e a relação contrária destes componentes com o rendimento e a CCS, isto é, a elevada concentração de sólidos determina a necessidade de menor quantidade de leite para produzir um kg de queijo. Neste mesmo fator observa-se uma relação positiva entre a CCS do leite cru e o rendimento do queijo, necessitando-se maior quantidade de leite com alta CCS para confeccionar um kg de queijo. O rendimento simples para o leite de baixa CCS foi de 8,49 litros de leite/kg de queijo, contra 8,94 para o leite de alta CCS.

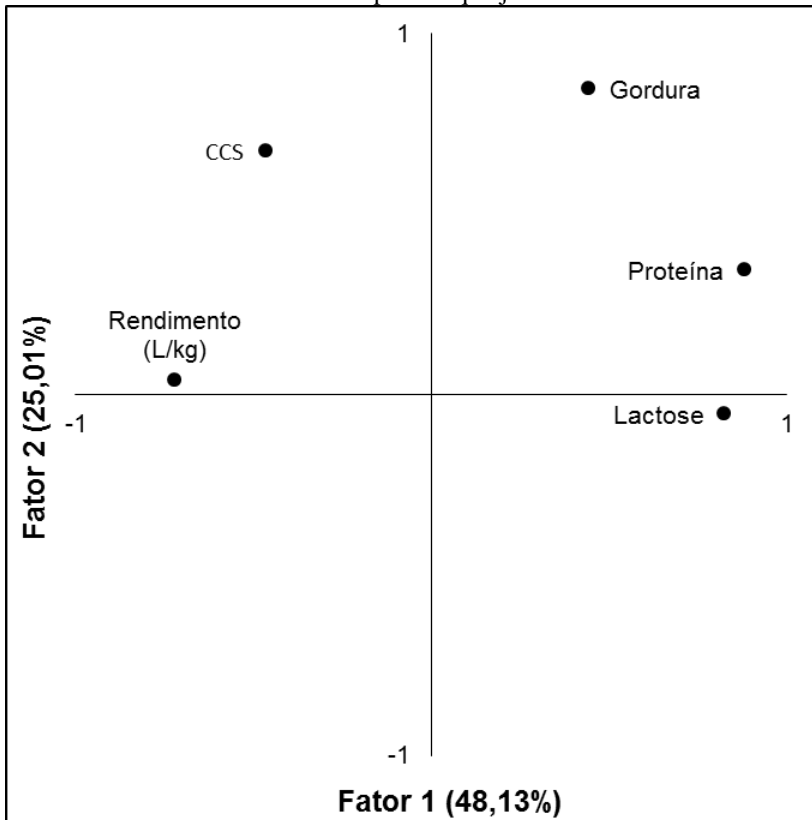
No fator 2 é possível observar que a CCS e o teor de gordura do leite cru possuem relação forte e positiva entre si. As comunalidades demonstram a relevância de cada variável utilizada nesta análise.

Tabela 2 – Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas e composição do leite cru e rendimento simples de queijo.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Proteína	0,8832	0,3463	0,8477
Lactose	0,8248	-0,0538	0,6989
Rendimento simples	-0,7219	0,0395	0,5222
Gordura	0,4442	0,8472	0,8488
CCS	-0,4646	0,6741	0,7397
% Variância	48,13	25,01	

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 1 – Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição e CCS do leite cru e rendimento simples de queijo.



CCS: Contagem de células somáticas no leite cru. Gordura: Gordura no leite cru. Lactose: Lactose no leite cru. Proteína: Proteína no leite cru. R (L/kg): Rendimento simples de queijo (L/kg).

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Uma segunda análise fatorial foi realizada relacionando-se a CCS do leite cru com a composição do leite e o rendimento seco de queijo (kg de sólidos totais de queijo/L de leite) como variável, sendo a relação entre as variáveis que compõem cada fator apresentada numericamente e graficamente (Tabela 3 e Figura 2). A soma dos dois primeiros fatores desta análise explicou 69,74% da variação total.

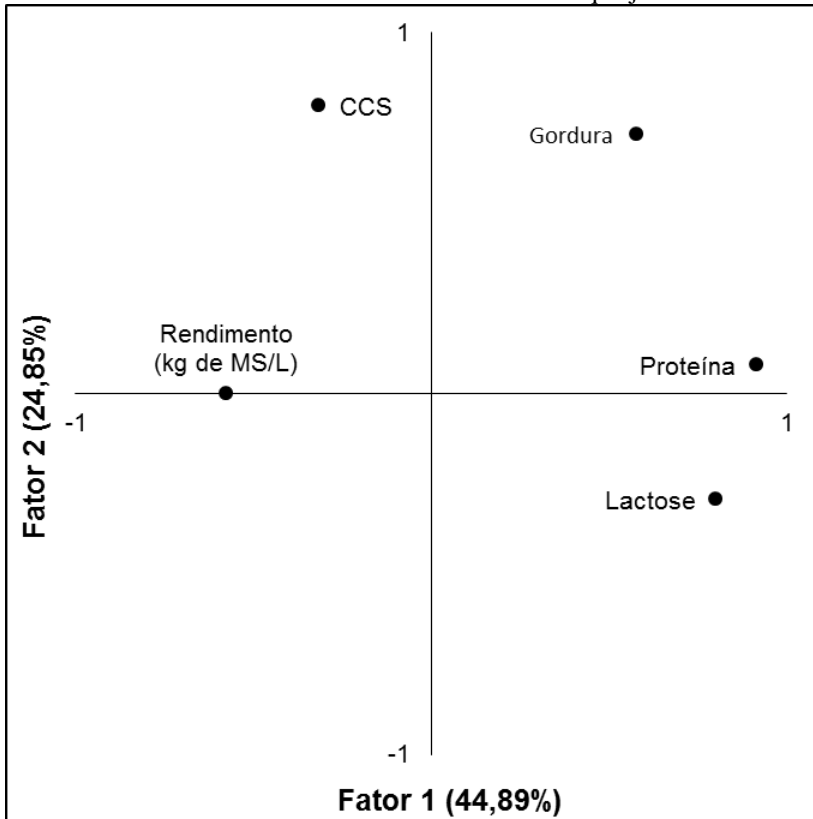
Os resultados foram similares aos apresentados na tabela 2 e figura 1, sendo que o fator 1 representa a relação positiva entre os teores de proteína, lactose e gordura do leite cru e contrária ao rendimento seco. O fator 2 representa a relação positiva entre a CCS e a gordura do leite cru.

Tabela 3 – Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas e composição do leite cru e rendimento seco de queijo.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Proteína	0,9155	0,0784	0,8426
Lactose	0,8008	-0,2928	0,7335
Rendimento seco	-0,5759	0,0010	0,3317
CCS	-0,3151	0,7970	0,7414
Gordura	0,5768	0,7180	0,8374
% Variância	44,89	24,85	

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 2 – Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição e CCS do leite cru e rendimento seco de queijo.



CCS: Contagem de células somáticas no leite cru. Gordura: Gordura no leite cru. Proteína: Proteína no leite cru. Lactose: Lactose no leite cru. R (kg de MS/L): Rendimento seco de queijo (kg de MS/L).

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

A influência dos dois grupos de CCS sobre o rendimento simples de queijo também foi avaliada relacionando-se as mesmas com a composição do soro de queijo. Os resultados podem ser observados na Tabela 4 e na Figura 3. A soma dos fatores representou 67,29% da variação total.

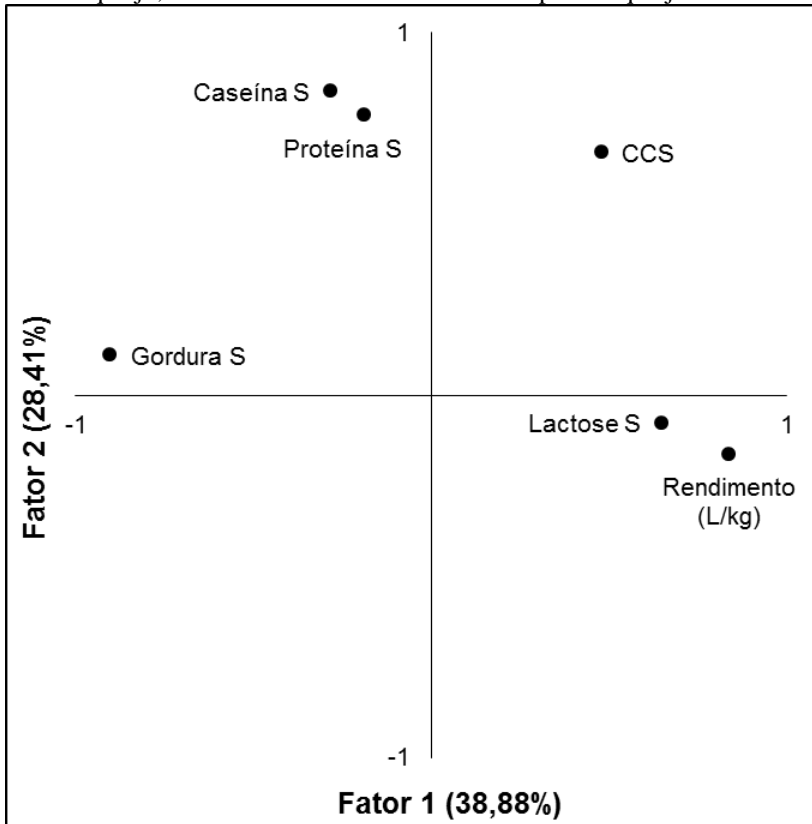
De acordo com o fator 1, o rendimento simples de queijo (L/kg), o teor de lactose do soro e a CCS do leite cru relacionam-se positivamente entre si e apresentam relação contrária com o teor de gordura do soro. No fator 2, pode-se observar a relação positiva entre a CCS do leite cru, a caseína e a proteína do soro.

Tabela 4 – Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas do leite cru, composição do soro de queijo e rendimento simples de queijo.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Rendimento simples	0,8382	-0,1623	0,7127
Lactose soro	0,6489	-0,0767	0,4219
Gordura soro	-0,9019	0,1097	0,8153
Caseína soro	-0,2811	0,8339	0,7436
Proteína soro	-0,1866	0,7717	0,6123
CCS	0,4800	0,6703	0,7317
% Variância	38,88	28,41	

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 3 – Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição do soro de queijo, CCS do leite cru e rendimento simples de queijo.



CCS: Contagem de células somáticas no leite cru. Caseína S: Caseína no soro de queijo. Gordura S: Gordura no soro de queijo. Lactose S: Lactose no soro de queijo. Proteína S: Proteína no soro de queijo. R (L/kg): Rendimento simples de queijo (L/kg).

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Para analisar as relações entre os dois grupos de CCS no leite cru, a composição do soro de queijo e o rendimento seco (kg de sólidos totais de queijo/ L de leite), uma análise fatorial foi realizada. Os resultados estão elucidados na Tabela 5 e na Figura 4. A soma dos fatores explicou 67,17% da variação total.

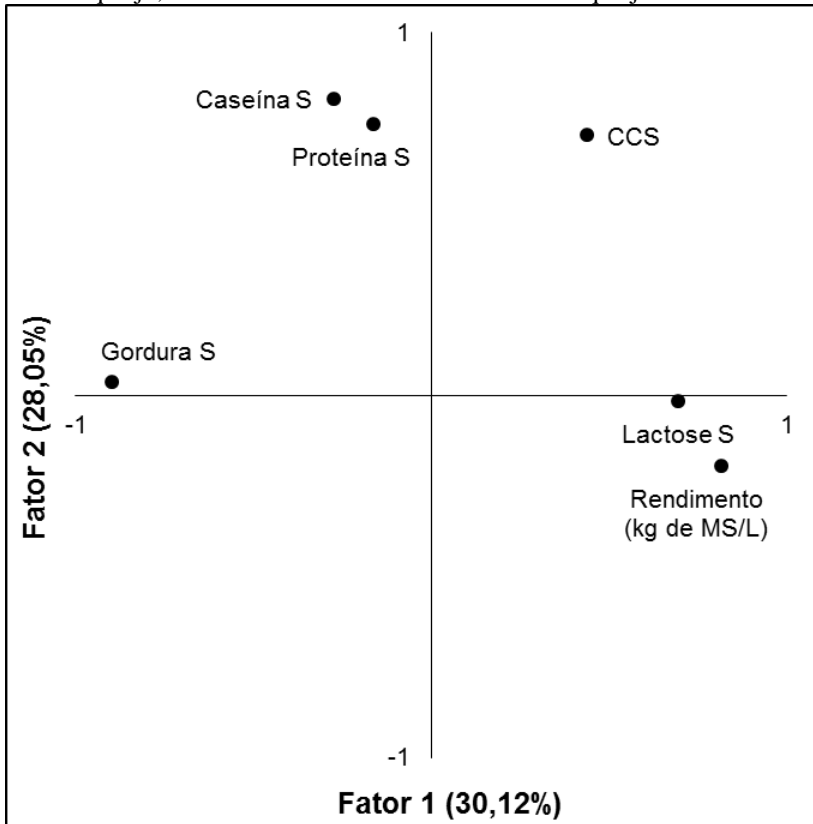
O fator 1 representa o rendimento de queijo seco e o teor de lactose do soro e a CCS do leite cru, que relacionam-se positivamente entre si, apresentando relação negativa com o teor de gordura do soro. No fator 2 é possível observar que CCS do leite cru, a caseína e proteína do soro estão relacionadas entre si.

Tabela 5 – Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona contagem de células somáticas do leite cru, composição do soro de queijo e rendimento seco de queijo.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Rendimento seco	0,8258	-0,2323	0,7055
Lactose soro	0,6964	-0,0497	0,4853
Gordura soro	-0,8989	0,0756	0,8081
Caseína soro	-0,3155	0,8292	0,7434
CCS	-0,1600	0,6962	0,7062
Proteína soro	0,4387	0,7520	0,5817
% Variância	30,12	28,05	

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 4 – Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de composição do soro de queijo, CCS do leite cru e rendimento seco de queijo.



CCS: Contagem de células somáticas no leite cru. Caseína S: Caseína no soro de queijo. Gordura S: Gordura no soro de queijo. Lactose S: Lactose no soro de queijo. Proteína S: Proteína no soro de queijo. R (kg de MS/L): Rendimento seco de queijo.

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

5.3 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO LEITE UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS QUEIJOS

Na Tabela 6 encontram-se os resultados descritivos da composição do leite cru, dividido pelo grupo de CCS, utilizado como matéria prima na produção dos queijos colonial.

Tabela 6 – Composição do leite cru, de acordo com a contagem de células somáticas (CCS).

Grupo	CCS < 550	CCS > 550
Variável Leite Cru	Média ± DP	Média ± DP
CCS x 10 ³	372 ± 85	652 ± 99
<i>Composição (g/100 g)</i>		
Gordura	3,96 ± 0,74	4,18 ± 0,45
Proteína	3,36 ± 0,07	3,33 ± 0,03
Lactose	4,21 ± 0,04	4,19 ± 0,04
Sólidos totais	12,53 ± 0,85	12,62 ± 0,67
Sólidos desengordurados	8,57 ± 0,13	8,54 ± 0,11

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

A Tabela 7 apresenta as médias encontradas no leite cru para a enumeração de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, agrupados de acordo com a CCS.

Tabela 7 – Estatística descritiva da enumeração de microrganismos mesófilos e psicrotróficos do leite cru, de acordo com seu grupo de contagem de células somáticas.

Grupo	CCS < 550	CCS > 550
Variável Leite Cru	Média ± DP	Média ± DP
Mesófilos (log ₁₀ UFC/mL)	6,826 ± 0,704	6,839 ± 0,463
Psicrotróficos (log ₁₀ UFC/mL)	6,879 ± 0,385	7,210 ± 0,560

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

5.4 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS

Os microrganismos pesquisados nos queijos seguiram as diretrizes da RDC nº12 para queijos de média umidade. Os resultados para *Staphylococcus* sp. e coliformes termotolerantes seguem descritos na Tabela 8. de acordo com seu grupo de CCS, onde ao todo foram testadas 28 amostras de queijo. Não foram identificados *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas.

Listeria monocytogenes e *Salmonella* sp. não foram detectadas, apresentando conformidade com a legislação brasileira.

Tabela 8 – Estatística descritiva da enumeração de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* sp. no queijo, agrupados de acordo com a contagem de células somáticas.

Grupo	CCS < 550	CCS > 550
	Média ± DP	Média ± DP
Variável Queijo		
Coliformes 45°C (NMP/g)	2307 ± 246	1494 ± 1002
<i>Staphylococcus</i> sp. (log ₁₀ UFC/g)	4,923 ± 0,414	4,309 ± 0,448

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

5.5 INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS DO LEITE CRU NO QUEIJO

Uma análise multifatorial foi realizada para verificar se existia relação ou não, entre a microbiota do leite cru e do queijo produzido a partir deste leite. O grupo dos coliformes termotolerantes (a 45°C) e o gênero *Staphylococcus* sp. foram os microrganismos avaliados. A relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada numericamente e graficamente na Tabela 9 e na Figura 5, respectivamente. A soma dos fatores explicou 71,15% da variação total.

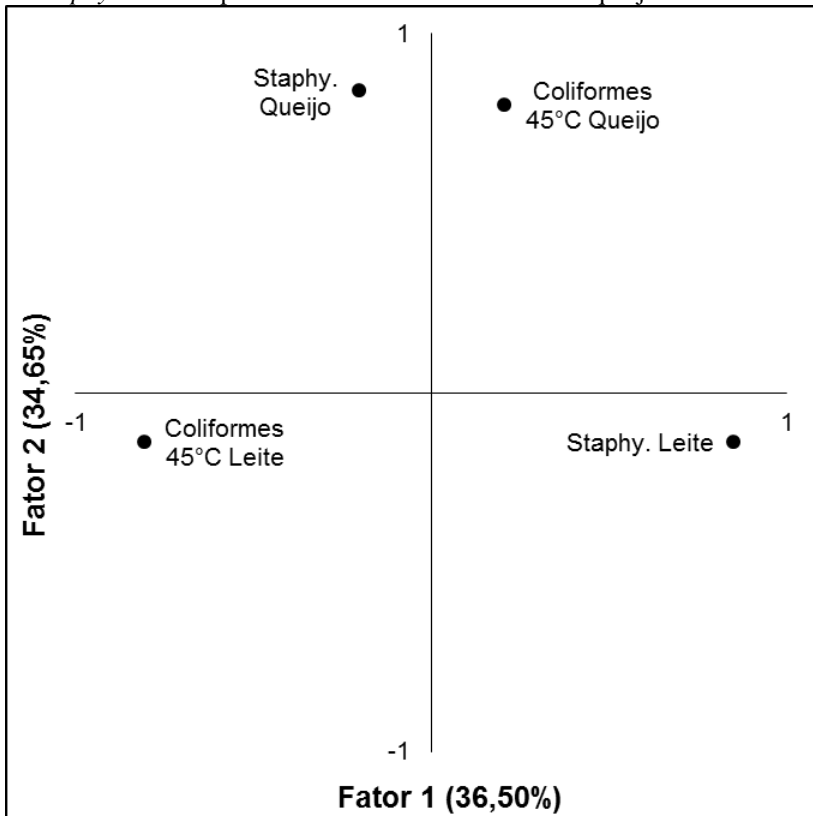
No fator 1 observa-se que a contaminação do queijo é independente da contaminação leite e que os coliformes termotolerantes possuem relação forte e contrária com o gênero *Staphylococcus* no leite cru. O fator 2 representa a relação entre o grupo coliformes termotolerantes e o gênero *Staphylococcus* no queijo.

Tabela 9 – Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas na análise fatorial que relaciona enumeração de *Staphylococcus* sp. e coliformes a 45°C no leite cru, com a enumeração *Staphylococcus* sp. e coliformes a 45°C no queijo.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
<i>Staphylococcus</i> sp. leite cru	0,8533	-0,1371	0,7451
Coliformes 45°C leite cru	-0,8054	-0,1381	0,6697
<i>Staphylococcus</i> sp. queijo	-0,2003	0,8400	0,7432
Coliformes 45°C queijo	0,2063	0,8014	0,6876
% Variância	36,50	34,65	

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 5 – Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de enumeração de *Staphylococcus* sp. e coliformes termotolerantes no leite cru e enumeração de *Staphylococcus* sp. e coliformes termotolerantes no queijo colonial.



Coliformes 45 °C: Enumeração de coliformes termotolerantes. *Staphy.*: Enumeração de *Staphylococcus* sp.

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

5.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS

A estatística descritiva das características físico-químicas dos queijos colonial, agrupados de acordo com a CCS, segue na Tabela 10.

Tabela 10 – Estatística descritiva das características físico-químicas dos queijos, agrupados de acordo com a contagem de células somáticas.

Grupo	CCS < 550	CCS > 550
Variável Queijo	Média ± DP	Média ± DP
Umidade (%)	46,8 ± 1,5	45,1 ± 1,1
Cinzas (%)	4,4 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Extrato Etéreo (%)	24,5 ± 1,7	25,4 ± 1,5
Proteína Bruta (%)	21,7 ± 2,35	22,6 ± 1,3
Nitrogênio (%)	97,5 ± 0,7	97,7 ± 0,2
Sódio (mg/kg)	3,4 ± 0,4	3,5 ± 0,2
Potássio (mg/kg)	6175 ± 1449	6357 ± 962
Cálcio (mg/kg)	651 ± 89	646 ± 49
Fósforo (mg/kg)	66356 ± 552	7180 ± 560
Energia Bruta (kcal/kg)	3793 ± 227	4029 ± 309

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

6 DISCUSSÃO

O pior rendimento simples do queijo foi obtido a partir de leite com maior CCS, apresentando uma redução de aproximadamente 5,3% (8,49 contra 8,94 litros de leite/kg de queijo) o que corrobora com trabalhos realizados com outros tipos de queijo. Klei et al. (1998) encontraram uma diminuição de 4,34% no rendimento do queijo cottage quando em CCS superior a 800 mil cel/mL, enquanto Politis e Ngkwai-Hang (1988b) observaram que aumentando a CCS de 100 mil cel/mL para 900 mil cel/mL ocorria um decréscimo de 11% no rendimento do queijo cheddar. No Brasil, a piora de rendimento em queijos Minas Frescal foi relatada na ordem de 9,81% quando produzidos com leite de CCS ≥ 600 mil cel/mL comparado a CCS < 200 mil cel/mL (MATIOLI et al. 2000) e 18,3% quando os queijos eram elaborados com leite comparando grupos ≤ 200 mil cel/mL e >750 mil cel/mL (COELHO et al. 2014). A diminuição no rendimento dos queijos pode estar relacionada à diminuição nas concentrações de caseína, nas alterações no balanço eletrolítico e na atividade de enzimas oriundas das células somáticas (AULDIST; HUBBLE, 1998). Porém, Mazal et al. (2007), avaliando dois níveis de células somáticas na produção do queijo prato (<200 mil cel/mL e > 600 mil cel/mL) não encontraram diferenças significativas no rendimento. Deve-se considerar que os trabalhos acima foram realizados em laboratório, com situações ideais de controle, diferentemente do presente trabalho que foi realizado em condições reais de produção em nível de indústria de laticínios, onde inúmeras variáveis não podem ser totalmente controladas.

A relação positiva entre os teores de gordura, proteína e lactose do leite cru e a relação contrária destes componentes com o rendimento e a CCS (Fator 1 na Tabela 2 e Figura 1) indica que elevada CCS está relacionada ao menor teor de sólidos no leite cru e pior será o rendimento simples, isto é,

será necessário maior volume de leite para produzir 1,0 kg de queijo. Klei et al. (1998), Cooney et al. (2000), Vianna et al. (2008) e Alessio (2013) relataram redução nos teores de lactose quando em alta CCS. Essa diminuição ocorre porque a lactose passa da glândula mamária para a corrente sanguínea, o que pode ser demonstrado por concentrações elevadas de lactose no sangue e na urina de vacas com mastite, devido ao aumento de permeabilidade vascular (AULDIST, 2000; PESSOA et al., 2012). Outras duas possibilidades são a redução da síntese pela glândula mamária acometida (PEREIRA et al., 1997) e utilização da lactose pelos patógenos intramamários (SHUSTER et al. 1991; SILANIKOVE et al., 2014).

Com relação à proteína, encontram-se resultados conflitantes onde sugere-se que quando em mastite, ocorre redução na síntese e secreção de caseína devido aos danos físicos sofridos pelas células da glândula mamária ao mesmo tempo em que ocorre influxo de proteínas do soro para a glândula mamária a partir do sangue, equilibrando os níveis de proteína no leite cru (AULDIST, 2000). Exemplos disso foram relatados por Ma et al. (2000) que apesar de encontrarem aumento no teor de proteína no leite em relação a CCS houve redução de 2% no teor de caseína e Mazal et al. (2007) que encontraram decréscimo no teor de proteína do leite de alta CCS e também verificaram uma redução de 9% no teor de caseína, proteína essencial para a produção de queijo.

Politis e Ng-Kwai-Hang (1988a) e Auld et al. (1996) relataram redução nos teores de gordura em leite com alta CCS, como ocorreu no Fator 1 (Tabela 2 e Figura 1). Acredita-se que essa redução ocorre devido à diminuição da síntese e secreção de gordura, pois o epitélio da glândula mamária é danificado durante a mastite (POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988a; AULDIST et al., 1996; AULDIST, 2000). No Fator 2 (Tabela 2 e Figura 1), observa-se a relação forte e positiva entre a CCS e a gordura. O aumento do teor de gordura no leite quando em mastite não está completamente

elucidado, mas, em um estudo que avaliou o aumento da CCS do leite de 450 mil para 849 mil células/mL, Ma et al. (2000) também encontraram um aumento no teor de gordura de 3,43% para 4,04%. Os autores atribuíram este aumento no teor de gordura do leite ao decréscimo no volume de leite produzido que foi de 30%, em resposta ao processo inflamatório.

A composição do leite tem influência direta sobre o rendimento industrial dos produtos lácteos. Nos queijos, a proteína, especialmente a caseína, e a gordura do leite encontram-se concentradas, o que as torna claramente relacionadas ao rendimento de fabricação dos mesmos (GILLES; LAWRENCE, 1985; VIOTTO; CUNHA, 2006). Essa relação é observada no Fator 1 (Tabela 2 e Figura 1) que elucidada que quanto maior o teor de sólidos na matéria prima, melhor será o rendimento de queijo.

Existe uma relação contrária entre o teor dos componentes sólidos do leite e o rendimento seco (Tabela 3 e Figura 2), ou seja, o menor teor de sólidos totais no leite levou à necessidade de maior volume de leite por kg de matéria seca de queijo, indicando relações semelhantes às apontadas para o rendimento simples.

A perda da gordura do leite para o soro é dependente de diversos fatores, tais como teor de proteína, tempo e temperatura de pasteurização, pH, acidez e temperatura do leite no momento em que o coalho é adicionado (FURTADO, 2005). Tendo em vista todas essas variáveis, é possível que a relação contrária encontrada no Fator 1 (Tabela 4 e Figura 3) entre rendimento simples, teor de lactose do soro e CCS do leite cru possa sofrer influência de variáveis externas, pois na literatura encontra-se que em situações de leite de alta CCS as perdas de gordura para o soro aumentaram (BARBANO, et al. 1991; COONEY et al., 2000; MATIOLI et al., 2000) ou não sofreram influência (MAZAL et al., 2007), contradizendo o encontrado neste trabalho. As mesmas relações foram observadas para o rendimento seco (Tabela 5 e Figura 4).

As perdas dos componentes sólidos para o soro são utilizadas para avaliar a eficiência da fabricação do queijo. A relação contrária entre os teores de caseína e proteína do soro de queijo com a CCS do leite cru (Tabela 4 e Figura 3), indica que quanto maior a CCS no leite cru, maiores serão as perdas de sólidos no soro de queijo e menor será a eficiência de produção do queijo. Politis e Ng-Kwai-Hang (1988b) avaliando a eficiência da produção do queijo cheddar encontraram médias de perdas para o soro de queijo de 28,63% e de 6,78% para proteína e caseína, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos relatados anteriormente por outros autores, como Barbano e Sherbon (1984) e Gilles e Lawrence (1985) que avaliaram as perdas no soro de queijo cheddar.

Os valores médios para os principais componentes do leite cru (Tabela 6) encontram-se em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela IN n° 62 (BRASIL, 2011) para leite cru refrigerado. Os teores de lactose não possuem limites estabelecidos pela normativa IN n°62/2011, segue-se, portanto o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952) que determina teores mínimos de 4,3% de lactose. Desta forma, os valores médios encontrados para lactose (Tabela 6) estão abaixo do limite mínimo exigido. Machado et al. (2000) avaliaram a composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros de acordo com a CCS. Estes autores encontraram média de teor de lactose de 4,51 g/100 g, resultado superiores aos apresentados neste trabalho (Tabela 6) e os mesmos autores afirmaram que leite com CCS acima de 500 mil cel/mL reduzia significativamente os teores de lactose, corroborando com os resultados encontrados por Auld et al. (1995).

A legislação brasileira para leite cru refrigerado, IN n° 62 (BRASIL, 2002), limita a contagem de microrganismos mesófilos em até $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Como é possível observar na Tabela 7 as médias das contagens verificadas durante as análises do leite cru para a produção dos queijos colonial

apresentaram-se muito além do limite estabelecido em lei. Silva et al. (2010) avaliaram o silo de estocagem de dois laticínios e também encontraram contagens altas de mesófilos aeróbios, $1,42 \times 10^8$ e $2,83 \times 10^8$, e atribuíram a elevada carga microbiana do leite às condições de estocagem e higiene dos tanques nas propriedades e no transporte do leite até o laticínio.

Esta mesma legislação que define critérios para microrganismos mesófilos aeróbios não compreende os microrganismos psicrotróficos, mas sabe-se que é imprudente a fabricação de produtos a partir de leite cru com contagem de psicrotróficos superior a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL (PINTO et al., 2006). Os resultados encontrados (Tabela 7) foram superiores aos sugeridos na literatura. As fontes mais comuns de contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicrotróficas são utilização de água contaminada, práticas de higiene impróprias e mastite (MURPHY; BOOR, 2000). Os maiores problemas que estes microrganismos podem causar nos queijos são sabores indesejáveis e redução no rendimento de fabricação (BANKS et al., 1988; CROMIE, 1992; CHEN et al., 2003; BERSOT et al., 2010). Isso ocorre devido às proteases e lipases produzidas pelas psicrotróficas que são termoresistentes e podem possuir atividade residual superior a 60% após a pasteurização e de 20% após o tratamento de ultra alta temperatura (UHT) e desta forma causar alterações no leite e derivados (SHAH, 1994; MUIR, 1996; CHEN et al., 2003).

As variáveis contaminação inicial do leite cru e contaminação dos queijos apresentaram-se independentes uma da outra na análise fatorial (Tabela 9 e Figura 5), muito provavelmente por causa do tratamento térmico, pasteurização rápida, empregado na produção dos queijos, que é capaz de reduzir 99,5% da carga microbiana inicial. Todavia, a mesma análise demonstrou relação forte e contrária entre o grupo dos coliformes termotolerantes e o gênero *Staphylococcus* sp. (Fator 1). Inúmeros autores já relataram a inibição de *Staphylococcus aureus* por bactérias do grupo coliformes

(WYNNE; NORMAN, 1953; DACK; LIPPITZ, 1962; GRAVES; FRAZIER, 1963). Sabe-se que se as condições do ambiente permitirem o crescimento dos coliformes estes vão colaborar com outras bactérias para suprimir os estafilococos (DIGIACINTO; FRAZIER, 1966). Certas estirpes de *E. coli* produzem colicinas, bacteriocinas, que exercem efeito antagonista contra outras bactérias presentes no meio e levam a essa capacidade de supressão sobre outros microrganismos (LEVINE; TANIMOTO, 1954).

Após o tratamento térmico adequado dos alimentos, os estafilococos assim como seus competidores são destruídos. Contudo, no caso de uma recontaminação os estafilococos podem apresentar crescimento desenfreado, assim como qualquer outra bactéria que for inoculada (DIGIACINTO; FRAZIER, 1966), o que pode ser observado no Fator 2 da Tabela 9 (Figura 5), onde coliformes termotolerantes e estafilococos estão relacionados positivamente entre si, indicando uma contaminação posterior ao tratamento térmico, possivelmente na manipulação dos queijos.

De acordo com a RDC n° 12 (BRASIL, 2001), em uma amostra indicativa, os queijos de média umidade podem apresentar até 1000 NMP/g de coliformes a 45 °C. As médias das análises dos grupos divididos conforme CCS podem ser observados na Tabela 8. Existem limites para a presença desses microrganismos nos alimentos porque eles indicam contaminação de origem fecal e possível presença de patógenos e/ou deteriorantes, logo, são indicadores das condições higiênico-sanitárias de fabricação e manipulação dos alimentos (JAY, 2005). Das 28 amostras de queijo colonial analisadas 92,85% (26 amostras) encontraram-se acima do limite estabelecido para coliformes, resultado muito superior do encontrado por Pereira et al. (1999) de 52% para queijo Minas Padrão e de Salotti et al. (2006) de 66,7% para queijo Minas Frescal.

Quanto aos estafilococos coagulase positiva a legislação brasileira para os queijos de média umidade (RDC nº12/2001) estabelece limites de até 1000 UFC/g. A espécie mais representativa deste gênero é o *Staphylococcus aureus*. Segundo Jablonski e Bohach (2001) para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias 10^5 a 10^6 células de *S. aureus* por grama de alimento. Na Tabela 8 é possível observar as médias dos resultados encontrados para contagem total de estafilococos, mas não houve ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva, resultados estes bem conflitantes com Arruda et al. (2007) que pesquisaram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas Frescal e Padrão em Goiânia, e observaram que 100% dos queijos Minas Frescal e 75% dos queijos Minas Padrão encontravam-se impróprios para o consumo de acordo com os critérios brasileiros.

Não foi verificada a presença *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes* sendo este resultado satisfatório, visto que enquadra-se aos padrões determinados pela RDC nº12 (BRASIL, 2001). Para qualquer categoria de alimento esta resolução define que estes microrganismos devem estar ausentes em uma amostra de 25 g. Dionizio et al. (2003) pesquisaram *Salmonella* sp. em amostras queijo Minas Frescal e requeijão em barra e não encontraram o microrganismo. Os autores relacionaram a ausência da bactéria à existência de grande multiplicação de coliformes no meio seletivo para *Salmonella* sp. Da mesma forma, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, Peresi et al. (2001) não identificaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 60 amostras de queijo Minas Frescal.

O queijo colonial não possui Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ). O MAPA o enquadra como queijo semi-gorduroso (25,0 a 44,9% de gordura) e de média umidade (36 a 45,9%) conforme a Portaria nº146 (BRASIL,

1996). As médias encontradas para as características físico-químicas, de acordo com o nível de CCS, (Tabela 10) reúnem informações até então não publicadas para o queijo colonial, as quais poderão ser úteis para uma possível caracterização deste tipo de queijo. Considerando o desvio padrão encontrado, os queijos, de ambos os grupos de CCS, oscilam entre as categorias de média a alta umidade. Nesta situação, a análise fatorial não revelou relação entre a umidade e as demais variáveis analisadas, como CCS e rendimento de queijo. Mas, Mazal et al. (2007) observaram que em leite com alta CCS pode ocorrer a inibição da cultura lática adicionada, pelos fatores inibidores produzidos pelos leucócitos presentes, o que impede a alteração do pH da massa de queijo (processo necessário para a adequada sinérese da massa) resultando em queijo prato com 2% a mais de umidade comparados aos queijos produzidos com leite de baixa CCS. Outros autores também relataram maiores teores de umidade em queijos produzidos com leite de alta CCS (JAEGGI et al., 2003; VIANNA et al., 2008). A alta umidade nos queijos aumenta a atividade de água para os microrganismos e pode desta forma reduzir a vida de prateleira destes produtos, devido à deterioração precoce.

No que concerne ao teor de gordura dos queijos, considerando o desvio padrão de ambos os grupos, os queijos estão alternando de categoria, de semi-gorduroso (25-44,9%) a magro (10-24,9%). A falta de padrão nos resultados físico-químicos evidencia a necessidade de critérios mais rigorosos para produção deste queijo, ou seja, um RTIQ.

7 CONCLUSÕES

Elevada contagem de células somáticas influencia negativamente o rendimento simples e seco do queijo colonial, com maiores perdas de componentes sólidos no soro de queijo, diminuindo a eficiência na fabricação dos queijos em nível de indústria.

A contaminação dos queijos independe da contaminação da matéria prima sendo que os microrganismos do grupo coliformes apresentaram relação contrária aos estafilococos no leite cru e positiva no queijo. Apesar de não ser identificada a presença de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp., a grande maioria dos queijos não está em conformidade quanto à contagem de coliformes termotolerantes.

Os queijos não apresentaram padronização quanto à sua composição físico-química, porém podem ser enquadrados dentro das normas estabelecidas para queijos de média umidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Captação de leite pelas indústrias de queijo no Brasil.** Dados não publicados, disponibilizados via email. 2015.

AKERS, R.M.; NICKERSON, S. C. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n.4, p. 275-89, 2011.

ALESSIO, D. R. M. **Estudo meta-analítico e análise de banco de dados do teor de lactose no leite bovino.** 2013. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

ANDREATTA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. dos; LIMA, C. G. de; MUSSARELLI, C.; MARQUESI, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. de. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 166-170, 2007.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotóxicas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão para resíduos de antibióticos.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 10, p. 105-115.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

ARRUDA, M. L. T.; NICOLAU, E. S.; REIS, A. P.; ARAÚJO, A. S.; MESQUITA, A. J. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, 2007.

AULDIST, M. J. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. Proceedings of. In: PACIFIC CONGRESS ON MILK QUALITY AND MASTITIS CONTROL, 2000, Nagano, Japan, p. 191-204.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MCDOWELL, G. H. Changes in the compositional of milk from normal and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; SUTHERLAND, B. J.; MAYES, J. J.; MCDOWELL, G. H.; ROGERS, G. L. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v.63, n.2, p.269-280, 1996a.

AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28-36, 1998.

AZZARA, C. D.; DIMICK, P. S. Lipolytic enzymes activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p.1804-1812, 1985.

BANKS, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPHS, J.D.; MUIR, D.D. Acomparison of the effects of storage of raw milk at 2 °C and 6 °C on the yield and quality of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v. 5, p. 9-16, 1988.

BARATTA, M.; VOLPE, M. G.; NUCERA, D.; GABAI, G.; GUZZO, N.; FAUSTINI, M.; MARTIGNANI, E. Differential expression of living mammary epithelial cell subpopulations in milk during lactation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 6897-6904, 2015.

BARBANO, D. M., RASMUSSEN, R. R.; LYNCH, J. M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 369-388, 1991.

BARBANO, D. M.; SHERBON, J. W. Cheddar cheese yields in New York. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 1873, 1984.

BARRY, J. G.; DONNELLY, W. J. Casein compositional studies: II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. **Journal of Dairy Research**, 48, p. 437-446, 1981.

BERSOT, L. dos S.; PEREIRA, J. G.; BARCELLOS, V. C.; ZANETTE, C. M.; PIEROZAN, E. A., MAZIERO, M. T. Quantificação de microrganismos indicadores de qualidade em leite cru e comportamento da microbiota ao longo do transporte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 373, p. 9-13, 2010.

BOLAND, F.; O'GRADY, L.; MORE, S. J. Investigating a dilution effect between somatic cell count and milk yield and estimating milk production losses in Irish dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1477-1484, 2013.

BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *L. monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, v.162, p.173-178, 1988.

BRASIL. Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 30 mar. 1952. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 dez. de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. de 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 21 set. de 2002. Seção 1, p. 13. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11 de março de 1996.

CARVALHO, L. de A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Embrapa gado de leite. **Importância Econômica.** Disponível em: <http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>. Acesso em: 24 set. 2015.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, p.65-73, 2009.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.

COELHO, K. O.; MESQUITA, A. J.; MACHADO, P. F.; LAGE, M. E.; MEYER, P. M. REIS, A. P. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1360-1368, 2014.

COONEY, S.; TIERNAN, D.; JOYCE, P.; KELLY, A. L. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 301-307, 2000.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense.** Florianópolis: Epagri, 2011.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. **Journal of Food Protection**, v. 45 p.172-207, 1982.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 96-100, 1992.

DACK, G. M., AND G. LIPPITZ. Fate of staphylococci and enteric microorganisms introduced into slurry of frozen pot pies. **Applied Microbiology**, v. 10, p. 472-479, 1962.

DIGIACINTO, J. V.; FRAZIER, W. C. Effect of Coliform and Proteus Bacteria on Growth of Staphylococcus aureus. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 1, 1965.

DIONIZIO, F. L.; VALLE, R. H. P.; MARQUES, S. C.; MENDONÇA, A. T.; BOARI, C. A.; FREITAS, R. F. Presença de Salmonella sp. em queijos Minas Frescal e requeijão em barras produzidos artesanalmente na região de Salinas, norte de Minas Gerais. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, I., CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo, 2003, p. 57.

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri/Cepa, 2013. 182 p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOX, P. F. Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.;

WONG, D. W. S. (Eds.). **Handbook of food enzymology**. New York, USA: Marcel Dekker. p. 255–277, 2003.

FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 1. **International Dairy Journal**, v.16, p. 500-516, 2006.

FOX, P. F., GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: An Aspen Publication, 2000. 587p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200 p.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.1-15, 2007.

GIGANTE, M. L.; COSTA, M. R. Influência das células somáticas nas propriedades tecnológicas do leite e derivados. In: BARBOSA, S. B. P.; BATISTA, A. M. V.; MONARDES, H. III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, v.1, p. 161-174. 2008.

GILLES, J.; LAWRENCE, R. C. The yield of cheese. N.Z.J. **Dairy Science and Technology**, v. 20, n. 205, 1985.

GRANDISON, A. Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheesemaking. **Dairy Industries International**, v. 51, n.3, p.21-24, 1986.

GRAVES, R. R., AND W. C. FRAZIER. Food microorganisms influencing the growth of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**. v. 11, p. 513-516, 1963.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.A. The risk of listeriosis and hazard identification - A review. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.99, n.550, p.69-76, 2004.

HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 7, p. 2103-2112, 1994.

HILLERTON, J. E. Redefining mastitis based on somatic cell count. **IDF Bulletin** 345, p. 4-6, 1999.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 42, 2014. 36 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). *Listeria monocytogenes*. In: **Microorganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens**. London: Blackie Academic and Professional, p.141-182, 1996.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Recommendations for presenting of mastitis related data. **IDF Bulletin** 321. Brussels, Belgium. p. 7-25, 1997.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S. S. Invited review: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4999-5009, 2010.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J.

(Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM, 2001. p. 411-434.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JAEGGI, J. J.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; BERGER, Y. M.; JOHNSON, M. E.; MCKUSICK, B. C.; THOMAS, D. L.; WENDORFF, W. L. Hard Ewe's Milk Cheese Manufactured from Milk of Three Different Groups of Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 3082-3089, 2003.

KEHRLI, M. E.; SHUSTER, D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 619-627. 1994.

KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P. L. H. Indigenous proteinases in milk. **Advanced Dairy Chemistry**, v.1, p. 494-519, 2002.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progress of dairy science: Milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 1205-1213, 1998.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, p. 629-645, 2003.

LEVINE, M.; TANIMOTO, R. H. Antagonisms among enteric pathogens and coliform bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 67, p. 537- 541, 1954.

LÜBECK, G.M.; LARA, J.A. F.; BAGATINI, L.; KAMIKAZE, N. K. K.; MIGLIORANZA, L. H.S. Avaliação de características físico-químicas e microbiológicas de algumas marcas de queijo tipo colonial produzido no sudoeste do estado do Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 185-193, 2001.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p.1883-1886, 2000.

MATIOLI, G.P.; PINTO, S. M.; BARBANO, D.M. Effect of milk from cows with mastitis on the production of fresh minas cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.34, n.38-54, 2000.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk. **Journal of Dairy Science**, v.83, p. 264-274, 2000.

MAZAL, G.; VIANNA, P. C. B.; SANTOS, M. V.; GIGANTE, M.L. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.630–636, 2007.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; THALER NETO, A.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Avaliação da inocuidade e qualidade

microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, n. 1152, 2013.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**. v.39, p.7-16, 1984.

MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v.20, p. 606-611, 2000.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6628-6634, 2002.

OECD/FAO. The Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD – FAO. **Agricultural Outlook 2014**. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014/statistical-annex_agr_outlook-2014-16-en>. Acesso em: 23 set. 2015.

OLIVER, S. P.; CALVINHO, L. F. Influence of Inflammation on Mammary Gland Metabolism and Milk Composition. **Journal of Animal Science**, v. 73, p.18-33, 1995.

PAAPE, M. J.; CAPUCO, L. A. V.; GUIDRY, A. J.; BURVENICHT, C. Morphology, Function, and Adaptation of Mammary Cells in Normal and Disease States. **Journal of Animal Science**, v. 73, p.1-17, 1995.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999.

PEREIRA, A.R., MACHADO, P.F., BARANCELLI, G. et al. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista dos Criadores**, v. 67, n. 807, p.19-21, 1997.

PERESI, J. I. M.; GACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n.83, p.63-70, 2001.

PESSOA, R. B.; BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; SANTOS, B. P.; PARRA, A. C.; SOUZA, F. N.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação da apoptose de leucócitos polimorfonucleares CH138+ em leite bovino de alta e baixa contagem de células somáticas dados preliminares. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p.533-539, 2012.

PHILPOT, W.N., NICKERSON, S.C. **Mastitis: conter attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PINTO, C. L. de O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PILLAI, S. R.; KUNZE, E.; SORDILLO, L. M.; JAYARAO, B.M. Application of differential inflammatory cell count as a

tool to monitor udder health, **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1413-1420, 2001.

POLITIS, I.; NG KWAI HANG, K. F. Effects of somatic cell counts and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1711-1719, 1988a.

POLITIS, I.; NG KWAI HANG, K. F. Association between somatic cell counts of milk and cheese yielding capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1720-1727, 1988b.

POPESCU, A.; ANGEL, E. Analysis of milk quality and its importance for milk processors. **Zootehnie si Biotehologii**, v. 42, p. 501-506, 2009.

RHAM, O. DE; ANDREWS, A. T. Qualitative and quantitative determination of proteolysis in mastitic milks. **Journal of Dairy Research**, 49, p. 587-596, 1982.

RECHE, N. L. M.; THALER NETO, A.; D'OVIDEO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 828-834, 2015.

ROGERS, S. A.; MITCHELL, G. E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 6. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 49, n. 2, p. 70-74, 1994.

ROGERS, S. A.; SLATTERY, S. L.; MITCHELL, G. E.; HIRST, P. A., GRIEVE, P. A. The relationship between somatic cell count, compositions and manufacturing properties

of bulk milk 3. Individual proteins. **Australian Journal of Dairy Technology**. v. 44, p. 49-52, 1989.

ROOS, T. B.; SCHEID FILHO, V. B.; TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. dos S. de. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos. **Revista Higiene Alimentar**. v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

RUEGG, P. L. Uso de um novo teste rápido para contagem de células somáticas. In: X Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos – Sanidade. 2006. **Anais...** p. 222-229, 2006.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. da. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, C. A. F.; AUGUSTO, L. F. B.; AQUINO, A. A. Atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 832-836, 2007.

SANTOS, O. V. DOS; MARCONDES, T.; CORDEIRO, J. L. F. **Estudo da Cadeia do Leite em Santa Catarina** **Prospecção e demandas**. Florianópolis, SC: Epagri/Cepa, 2006.

SCHALLIBAUM, M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. **National Mastitis Council**, 2001. Inc. 40th Annual Meeting Proceedings, p. 38-46. 2001.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.

SHARMA, N.; SINGH, N.K.; BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 24, p. 429-43, 2011.

SHUSTER, D.E., HARMON, R.J., JACKSON, J.A. et al. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.11, p. 3763-3774, 1991.

SIGSIF. Sistema de Informação Gerencial de Inspeção Federal – MAPA. **Dados de produção de queijo colonial, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Dados não publicados, disponibilizados via email. 2014.

SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, F.; SHINDER, D. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. **BMC Physiology**, p.9-13, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624 p.

SILVA, M. A. P. da; SANTOS, P. A. dos; LEÃO, K. M.; NEVES, R. B. S.; GUIMARÃES, K. C.; NICOLAU, E. S.

Qualidade do leite na indústria de laticínios. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, 2010.

SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. In: **Bacteriological Quality of Raw Milk**. International Dairy Federation: Brussels, Belgium, p. 19-27, 1996.

STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.

TÖPEL, A. **Chemie und physik der milch**. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 2004. 756 p.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2010. 195 p.

USDA. **USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2016.

USDA. **USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cheese+Production+and+Consumption%3a+Summary+For+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2540&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 06 fev. 2016.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 534-538, 1988.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M.; DELLAVALLE, M. E.; SENYK, G. F. Variability in true protein, casein, nonprotein

nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.230-242,1987.

VIANNA, P. C. B.; MAZAL, G.; SANTOS, M. V.; BOLINI, H. M. A.; GIGANTE, M. L. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1743-1750, 2008.

VIOTTO, W. H.; CUNHA, C. R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: MESQUITA, A. J., DURR, J. W., COELHO, K. O. **Perpectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006, v. 1, p. 241-258.

WYNNE, E. S.; NORMAN, J. O. On the concept of "direct antagonism" in bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 243-246, 1953.

APÊNDICE A – Termo de consentimento



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA
CATARINA – UDESC
GABINETE DO REITOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEPESH

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa de mestrado intitulada “Avaliação do rendimento industrial, atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo colonial produzido a partir de leite com dois diferentes níveis de células somáticas” que fará a aplicação de um questionário tendo como objetivos caracterizar a propriedade, o rebanho e os métodos de obtenção, higiene e armazenamento do leite. Amostras de leite cru serão coletadas e analisadas para a Contagem bacteriana total, Composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais, caseína e lactose) e Contagem de células somáticas (CCS). Serão previamente marcados a data e horário para as perguntas utilizando o questionário e coleta de amostra de leite cru. O questionário será analisado na Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias e o leite analisado no Instituto Federal de Santa Catarina – Campus Concórdia e no Laboratório Estadual do Leite (CIDASC/UnC).

Os riscos destes procedimentos serão mínimos. As perguntas do questionário não devem implicar em constrangimentos pessoais, mas se assim ocorrer podem não ser respondidas. Da mesma forma ocorre com a coleta de amostras de leite. Essa é apenas uma coleta de leite assim como a realizada para o atendimento da normativa 62/2011 do MAPA, realizada mensalmente pelo laticínio. Esse leite será analisado físico-químico e microbiologicamente, não será submetido a análises que não as descritas acima. Mas se o senhor(a) preferir, não será coletada amostra de leite.

A sua identidade será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número. Os resultados dos questionários e das análises das amostras dos leite serão mantidos sob anonimato.

Os benefícios e vantagens em participar deste estudo serão a partir da caracterização da cadeia de lácteos no oeste catarinense será possível avaliar as reais necessidades dos produtores de leite e desta forma criar projetos futuros que atendam as suas precisões.

As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos serão os pesquisadores, professor responsável Andre Thaler Neto e a estudante de mestrado Cecília Alice Mattiello.

O(a) senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não-identificação do seu nome.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do pesquisador e outra com o sujeito participante da pesquisa.

Agradecemos a sua participação.

Prof. Andre Thaler Neto
Pesquisador Responsável
(49)2101-9212

Cecília Alice Mattiello
Mestranda
(49)8812-7506

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
CEPSH/UDESC

Av. Madre Benvenuta, 2007 – Itacorubi

Fone: (48)3321-8195 - e-mail: cepsh.reitoria@udesc.br

Florianópolis – SC 88035-001

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso

Assinatura _____ Local: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE B – Questionário

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

1-Nº identificação propriedade _____

2-Cidade _____

3-Proprietário _____ Data: __/__/__

4-Telefone _____

5-Área total da propriedade: _____

6- N° de animais em ordenha: _____

7- Raça dos animais: _____

8- PERFIL DO PRODUTOR/RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO

8.1- Número de pessoas moram na propriedade?

() Um () Dois () três () quatro () cinco () > cinco
 Quantas? _____

8.2- Renda líquida mensal da propriedade (Salário Mínimo Base: R\$ 788,00).

() Um () Dois () três () quatro () cinco () > cinco
 Quantos? _____

8.3- O leite é a principal atividade da propriedade?

() Sim () Algumas épocas do ano apenas () Não

8.4- Número de pessoas que trabalham com o leite?

() Um () Dois () três () quatro () cinco () > cinco

8.5- Quem são as pessoas que efetuam a ordenha?

() Esposa () Filho (s) () Esposa e filho

() Marido () Outro (s)

() Esposa e integrante da (x) Família
 Marido família

() Marido e () Funcionário

Filho (s)

8.6- Há quantos anos trabalha na atividade?

< de 1 ano 1 a 3 anos 4 a 6 anos 7 a 9 anos > 10 anos

8.7- Grau de escolaridade

Ensino fundamental completo incompleto
 Ensino médio completo incompleto
 Ensino superior completo incompleto
 Analfabeto

9-EQUIPAMENTOS DE ORDENHA E REFRIGERAÇÃO**9.1- Tipo de Ordenha**

Mecânica balde ao pé Mecânica canalizada
 Mecânica balde ao pé com transferidor Manual

9.2- Manutenção de equipamentos de ordenha

Periódica
 Eventual/ quando há problema
 Não Faz

9.3- Resfriamento do leite

Tanque de imersão Freezer
 Tanque de expansão Não resfria

9.4- Capacidade do tanque de expansão: _____ L**9.5- Média do volume de leite a cada ordenha: _____ L****9.6- Utiliza filtro no equipamento de ordenha? Sim Não****9.7- Há água quente para limpeza dos equipamentos?**

Sim Não

9.8- É realizado controle da temperatura da água?

Sim Não

9.9- Qual tipo de aquecedor? _____**9.10- O equipamento é enxaguado com água morna após a ordenha até que a água sai limpa?**

Sim Não

Como _____

9.11- É utilizado detergente alcalino na limpeza com água quente?

Sim Não

9.12- Realiza limpeza com detergente ácido?

Sim Não Qual o intervalo? _____

10- Como você faz o processo de ordenha? (enumerar em ordem cronológica, usando 0 para o que não for feito)

Lava as mãos antes de iniciar a ordenha. Como: _____

Faz o teste da caneca de fundo preto.

Elimina os primeiros jatos no caneco de fundo preto.

Lava/ limpa os tetos. Como: _____

Seca os tetos. Como: _____

Utiliza pré-imersão (pré-dipping). Qual desinfetante: _____

Desinfeta as tetas após a ordenha (pós-dipping). Qual desinfetante: _____

Resfria imediatamente o leite.

11- Tipo de Teste de Mastite

1. Teste da Caneca Diário

2. Teste da Caneca Semanal

3. Teste da Caneca Quinzenal

4. Teste da Caneca Mensal

5. Teste da Caneca quando acha necessário

6. CMT Diário

7. CMT Semanal

8. CMT Quinzenal

9. CMT Mensal

10. CMT quando acha necessário

12.1- A coleta de leite é realizada:

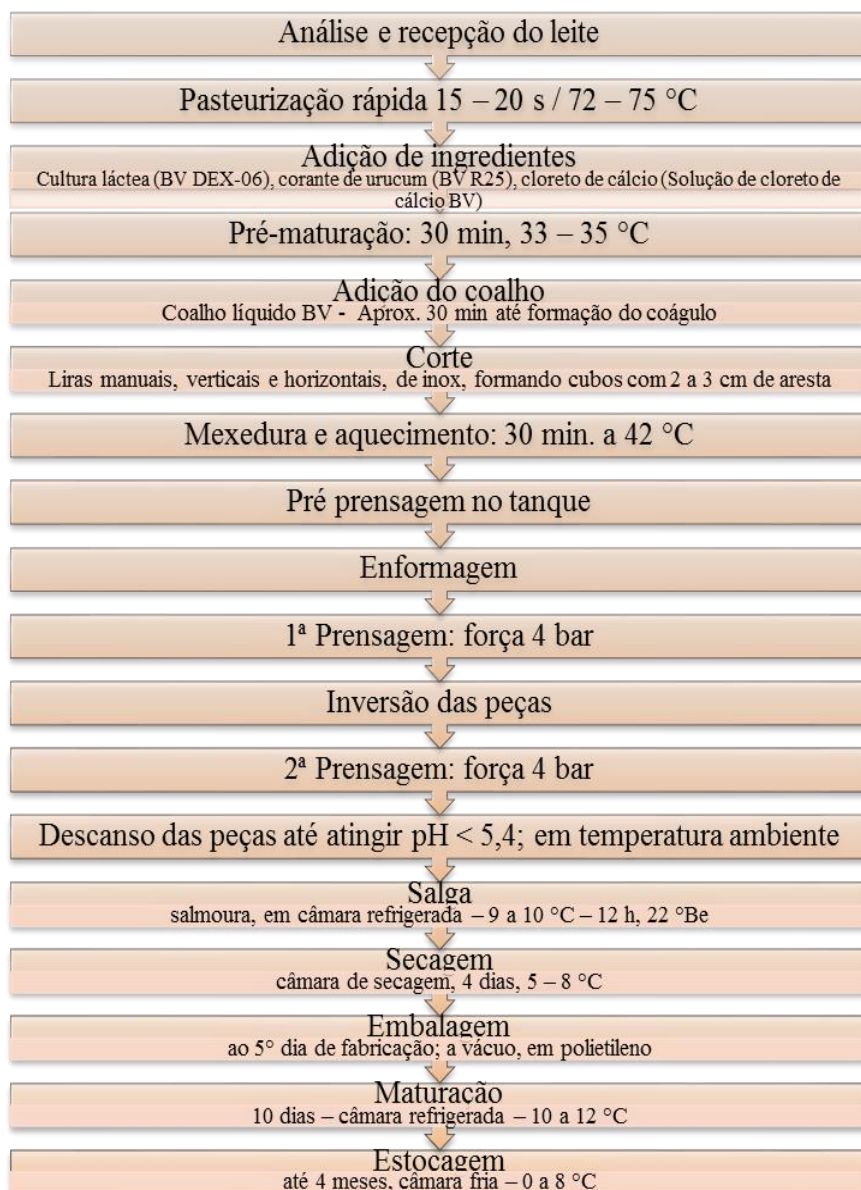
Diariamente

A cada 2 dias

A cada 3 dias

12.2- Recebe bonificação do laticínio por qualidade do leite? Sim Não

APÊNDICE C – Fluxograma do queijo colonial



APÊNDICE D – Análises Microbiológicas no leite

Enumeração de aeróbios mesófilos

Posteriormente as diluições até 10^{-6} em água peptonada, era feito o plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar (PCA). Com 1 mL da amostra na placa de Petri estéril, era vertido na placa 12 a 15 mL do PCA previamente fundido e resfriado a 44 - 46 °C. As placas eram incubadas 36 °C por 24 - 48h. Para homogeneizar o inóculo com o meio, aplicava-se a técnica de *Pour-plate*, que consiste em fazer movimentos das placas na forma de oito, de 8 a 10 vezes em sentido horário e anti-horário.

Coliformes a 35 °C e 45°C

As análises foram realizadas através da Técnica do Número Mais Provável (NMP). Para o teste presuntivo, alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas (10^{-1} a 10^{-3}) em água peptonada foram inoculadas em séries de 3 tubos de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubadas a 35 °C por 24 - 48h. Após a incubação, onde havia presença de gás nos tubos foi realizado o repique para os caldos Verde Brilhante e EC, para o teste confirmativo para coliformes a 35°C e coliformes 45°C, respectivamente. Após a incubação à temperatura respectiva e por 24 - 48h eram verificadas a presença ou ausência de gás nestes tubos, reportando-se às tabelas de NMP para a expressão dos resultados.

Enumeração de *Staphylococcus coagulase* positiva

Alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas (10^{-1} a 10^{-6}) em água peptonada eram inoculadas em ágar Baird-Parker adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio com auxílio de Alça de Drigalski e incubadas a 35 - 37 °C por 48h. Colônias típicas e atípicas eram repicadas para caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubado a 35 - 37 °C por 24h. A prova de produção de coagulase foi realizada utilizando-se plasma de coelho liofilizado (0,5 mL), onde a amostra (0,5 mL) permanecia em banho-maria a 37 °C com o plasma adicionado por 6h. Para as amostras positivas, prosseguia-se com o teste da catalase e a coloração de Gram para confirmação. Teste da

catalase: Adicionava-se 1 mL de peróxido de hidrogênio 3% à cultura, observando presença de borbulhamento (positivo) ou ausência (negativo).

Enumeração de microrganismo psicrotróficos

Após realizadas as diluições até 10^{-6} em água peptonada, era feito o plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar (PCA). Com 1 mL da amostra na placa de Petri estéril, era vertido na placa 12 a 15 mL do PCA previamente fundido e resfriado a 44 – 46 °C. As placas eram incubadas a 7 °C por 10 dias. Para homogeneizar o inóculo com o meio, aplicava-se a técnica de *Pour-plate*.

Para todos os casos de plaqueamento, após o período de incubação, fazia-se a contagem das colônias em contador manual de colônias. Eram escolhidas as placas com 25 a 250 colônias. Calculava-se-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da amostra multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

APÊNDICE E – Análises microbiológicas no queijo

Para a enumeração de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, 25 g de amostra eram pesadas assepticamente em câmara de fluxo laminar e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada (0,1%) em Bag-mixer[®], durante um minuto no *Stomacher*. Após a homogeneização, eram preparadas diluições decimais sucessivas, utilizando-se como diluente água peptonada 0,1%, a partir das quais eram inoculados os meios de cultura apropriados para cada análise.

Para a detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, 25g de amostra eram pesados assepticamente em câmara de fluxo laminar e homogeneizados com 225 mL de caldos de pré-enriquecimento específicos.

Coliformes a 35 °C e 45°C

As análises eram realizadas através da Técnica do Número Mais Provável (NMP). Para o teste presuntivo, alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas (10^{-1} a 10^{-3}) eram inoculadas em séries de 3 tubos de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubadas a 35 °C por 24-48h. Após a incubação, era verificada a presença de gás nos tubos e realizado o repique para os caldos Verde Brilhante e EC dos tubos positivos, para o teste confirmativo para coliformes a 35°C e coliformes 45°C, respectivamente. Após a incubação à temperatura e tempo adequados, era verificada a presença de gás nestes tubos, reportando-se às tabelas de NMP para a expressão dos resultados.

Enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva

Alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas (10^{-1} a 10^{-6}) eram inoculadas em ágar Baird-Parker adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio com auxílio de Alça de Drigalski e incubadas a 35-37 °C por 48 h. Colônias típicas e atípicas eram repicadas para caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubado a 35-37 °C por 24h. A prova de produção de coagulase era realizada utilizando-se plasma de coelho liofilizado, onde a amostra

permanecia em banho-maria a 37 °C com o plasma adicionado por 6 h. Para as amostras positivas, prosseguia-se com o teste da catalase e a coloração de Gram para confirmação.

Detecção de *Salmonella* sp.

A etapa de pré-enriquecimento da amostra era realizada utilizando-se água peptonada tamponada, incubada a 35 °C por 24h. Para o enriquecimento seletivo, eram inoculados, a partir do meio de pré-enriquecimento, os caldos Selenito-Cistina e Rappaport-Vassiliadis, incubados a 41 °C por 24h. A partir destes meios, eram inoculados os meios sólidos Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), a fim de proceder-se com o isolamento e seleção de colônias típicas de *Salmonella*.

As colônias suspeitas eram então inoculadas em ágar nutriente (24h - 36 °C) e submetidas às seguintes provas bioquímicas: fermentação de açúcares (ágar TSI), descarboxilação da lisina, produção de urease, motilidade, produção de H₂S e teste de indol. Se verificado perfil bioquímico compatível com *Salmonella* sp., era realizado o teste sorológico, utilizando-se soro somático polivalente para a confirmação da presença deste microrganismo, que baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com consequente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* polivalente “O”.

Detecção de *Listeria monocytogenes*

Para a etapa de enriquecimento seletivo, 25 gramas de queijo eram acondicionadas em saco plástico estéril, contendo 225 mL de Caldo de Enriquecimento para Listéria (LEB).

A seleção e o isolamento eram realizados em ágar Oxford (AO). No AO, as colônias de *Listeria* sp. apresentavam-se pretas, rodeadas por halo negro devido à hidrólise da esculina. Em seguida, as colônias típicas crescidas no AO eram repicadas para o Ágar Triptona de Soja (TSA) e para o extrato de levedura, onde permaneciam incubados a 30 °C por 24 - 48h. A confirmação da presença de *Listeria* sp. dava-se pela prova bioquímica por meio da

reação da catalase, do teste da motilidade, da coloração de Gram e do API. Identificação de *Listeria monocytogenes*: Para a diferenciação das espécies de *Listeria* sp. era utilizada a identificação por meio de um sistema de testes bioquímicos miniaturizados padronizados, o API Listeria (Biomeriux)[®].

Para todos os casos de plaqueamento, após o período de incubação, fazia-se a contagem das colônias em contador manual de colônias. Eram escolhidas as placas com 25 a 250 colônias. Calculava-se-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da amostra multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

APÊNDICE F – Análise centesimal do queijo

Matéria seca liofilizada

Em geral, a liofilização compreende uma das etapas de preparação das amostras de origem animal. Inicialmente, a amostra *in natura* era cortada em pequenos pedaços em forma de cubo (2 x 2 cm). Uma quantidade de 50 a 200 g ($\pm 0,01$) da amostra era pesada em uma bandeja de alumínio de 250 mL previamente tarada. A amostra era desidratada por no mínimo 48 h em um liofilizador JJ Científica LJI-030 (São Carlos, SP, Brasil) seguindo as recomendações de operação do fabricante do equipamento. A amostra era devidamente moída para determinações posteriores. A determinação da matéria seca liofilizada era realizada por gravimetria de acordo com a equação a seguir.

$$MS-Lio(\%) = \frac{m_{RS}}{m_i} \times 100$$

Onde:

MS-Lio: conteúdo de resíduo seco, em % (m/m), após liofilização;

m_{RS} : massa de resíduo liofilizado (g);

m_i : massa inicial de amostra *in natural* (g).

Matéria seca

O procedimento analítico para determinação do conteúdo de matéria seca era baseado no método IAL 012/IV descrito no manual de Métodos de Análises Físico-Químicas de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Inicialmente, cerca de 2 g ($\pm 0,0001$) da amostra eram pesados em um cadinho de porcelana previamente tarado. A secagem da amostra era realizada em estufa microprocessada Quimis Q317M (Diadema, SP, Brasil) a 105 °C por 18 horas. A determinação da matéria seca era realizada por gravimetria de acordo com a equação a seguir.

$$MS(\%) = \frac{m_{RS}}{m_i} \times 100$$

Onde:

MS: conteúdo de resíduo seco, em % (m/m), após aquecimento a 105 °C por 18 h;

m_{RS} : massa de resíduo seco (g);

m_i : massa inicial de amostra (g).

Matéria mineral

A análise para determinação do conteúdo de cinzas (matéria mineral) era baseada no método nº 36 descrito no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (CBAA, 2009). Inicialmente, cerca de 2 g ($\pm 0,0001$) da amostra eram pesados em um cadinho de porcelana previamente tarado. A secagem da amostra era realizada em estufa microprocessada Quimis Q317M (Diadema, SP, Brasil) a 105 °C por 18 horas. Em seguida, a amostra seca era calcinada em forno mufla a 550-600 °C até obtenção de cinzas claras (por no mínimo 3 horas).

A determinação da matéria mineral era realizada por gravimetria de acordo com a equação a seguir.

$$CZ(\%) = \frac{m_{RM}}{m_i} \times 100$$

Onde:

CZ: conteúdo de resíduo mineral, em % (m/m), após calcinação por 3 h;

m_{RM} : massa de resíduo mineral (g);

m_i : massa inicial de amostra (g).

Nitrogênio total em amostras sólidas pelo método de combustão

A concentração de N era determinada em analisador Leco FP-528 (St. Joseph, Michigan, USA) seguindo as recomendações do fabricante, de acordo com a AOAC 990.03. O gerenciamento do instrumento era realizado com o software Leco FP-528 (St. Joseph, Michigan, USA). Na determinação, 0,2 g ($\pm 0,0001$) da amostra era inicialmente pesado em um cadinho de folha de estanho. Em seguida, a amostra era introduzida automaticamente em um forno de decomposição a 850 °C com atmosfera rica em O₂ para rápida combustão. Sob fluxo de He ultrapuro (200 mL/minuto) e ação catalítica de Cu metálico a 750 °C, as espécies de NO_x geradas eram

reduzidas a N₂. O CO₂ e a H₂O produzidos na combustão eram removidos por filtração sobre suportes de Lecosorb (20-30 mesh) e Anhydron (10-16), respectivamente. O N₂ remanescente em fluxo de He era, então, detectado em célula de condutividade térmica. O conteúdo de N, expresso em mg.Kg⁻¹, era determinado por calibração externa usando uma curva analítica preparada com EDTA (Leco calibration sample P/N 502-092). A faixa de trabalho do equipamento era de 0.016 a 100%, equivalente a 0.04 até 300 mg em massa absoluta de N. O valor de proteína bruta é estimado considerando-se o fator de 6,38.

Extrato etéreo

O procedimento analítico para determinação de extrato etéreo era baseado no método oficial AOCS Am 5-04 aprovado pela *American Oil Chemists' Society*. Inicialmente, de 1 a 2 g ($\pm 0,0001$) da amostra eram pesados em uma bolsa-filtro Ankom XT4 previamente tarada. A bolsa filtro era selada e a amostra seguia para secagem a 105 °C por 3 h em estufa microprocessada Quimis Q317M (Diadema, SP, Brasil). A amostra era, então, extraída com éter de petróleo (faixa de destilação de 30-70 °C) sob alta pressão a 90 °C por 90 minutos em sistema Ankom XT15 (Macedon, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Após a extração, a amostra seguia novamente para secagem sob as mesmas condições descritas anteriormente. O conteúdo de extrato etéreo (constituído, predominantemente, por triacilgliceróis) era determinado indiretamente por gravimetria de acordo com a equação a seguir.

$$EE(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_3 - m_4)} \times 100$$

Onde:

EE: conteúdo de extrato etéreo em %;

m₁: massa da amostra seca a 105 °C por 3 h + massa da bolsa filtro (g);

m₂: massa da amostra extraída e seca a 105 °C por 3 h + massa da bolsa filtro (g)

m_3 : massa inicial da amostra + massa da bolsa filtro (g);

m_4 : massa da bolsa filtro (g).

Energia bruta

A energia bruta (valor calórico) de amostras sólidas era determinada em calorímetro Leco AC500 (St. Joseph, Michigan, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A determinação da energia bruta com este equipamento estava em conformidade com as normas ASTM D5865, ASTM D4809 e DIN 51900. Na determinação, 1 g ($\pm 0,0001$) da amostra era inicialmente pesado em um cadinho de metal, que posteriormente é introduzido em um vaso de decomposição. A combustão da amostra acontece em atmosfera rica em O_2 (400 psi) e a variação de temperatura (ΔT) do sistema era determinada. O resultado de energia bruta era expresso em Kcal/Kg. O desvio padrão relativo (DPR) era $\leq 0,05\%$ com base na análise do ácido benzóico em *pellet* de 1 g.

Elementos minerais

O procedimento analítico para abertura de amostras sólidas por digestão nítrico-perclórica era baseado no método oficial AOAC 975.03 (b) descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). Inicialmente, 0,5 g ($\pm 0,0001$) da amostra era pesado em um tubo para digestão de 100 mL e, em seguida, eram adicionados 6 mL de HNO_3 - $HClO_4$ 8:1 v/v. A mistura permanecia em repouso por 18 horas para decomposição preliminar. Então, a amostra era completamente digerida com o seguinte programa de aquecimento: mantinham-se a 140 °C por 30 minutos; aumentava-se a temperatura para 180 °C a uma taxa de 1 °C/minuto; mantinha-se a 180 °C para redução do volume até aproximadamente 1 mL. Após resfriamento, o volume do digerido era corrigido para 25 mL com água ultrapura e os elementos de interesse eram, posteriormente, analisados na solução da amostra.

A quantificação dos elementos Ca, P, Na e K era realizada por aspiração direta da solução da amostra (original ou devidamente diluída) em um espectrômetro de emissão óptica em plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES) PerkinElmer Optima™ 8300 (PerkinElmer Singapura PTE. LTD., Singapura) seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. A quantificação dos elementos era realizada por calibração externa, usando-se uma curva analítica mista preparada em água ultrapura. A concentração das espécies na amostra era calculada pela equação a seguir.

$$E(\text{mg.Kg}^{-1}) = \left(\frac{C_E \times FD \times V_i}{m_a} \right) \times 1000$$

Onde:

E: conteúdo do elemento de interesse (Ca, P, Na, K) em mg.Kg^{-1} ;
 C_E : concentração do elemento de interesse determinada na solução (mg/L);

FD: fator de diluição;

V_i : volume inicial da solução da amostra após a abertura (L);

m_a : massa de amostra (g).